

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von
Haunerschen Kinderspital

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Phänotyp und intrazelluläre Signaltransduktion
der antagonistischen Wirkung von
Anthrazyklinen auf Apoptoseinduktion durch
Vinca-Alkaloide**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lina Wolf

geb. Pannert

aus München

2017

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med Harald Ehrhardt

Mitberichterstatter: PD Dr. Gerald Schmid
PD Dr. Enrico De Toni

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen

2. Einleitung	1
2.1. Apoptose – der programmierte Zelltod	1
2.2. Molekulare Mechanismen der Apoptose	1
2.2.1. Caspasen als zentrale Exekutionsorgane der Apoptose	1
2.2.2. Der Rezeptor-vermittelte extrinsischer Apoptosesignalweg	2
2.2.3. Der Mitochondrien-abhängige intrinsischer Apoptosesignalweg	3
2.2.4. Die pro-apoptotische Funktion von JNK (c-Jun N-terminal Kinase) im extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg	6
2.2.5. Die verschiedenen Funktionen des Tumorsuppressors p53	7
2.3. Chemotherapeutika in der Tumorthherapie	8
2.3.1. Die pro-apoptotische Wirkung von Vincristin	10
2.3.2. Die pro-apoptotische Wirkung von Doxorubicin	10
2.3.3. Vinca-Alkaloide und Anthrazykline als Kombinationstherapie	10
2.4. Ziel der Arbeit	11
3. Material und Methoden	12
3.1. Materialien	12
3.1.1. Zellkultur	12
3.1.2. Zytostatika und Stimulanzen	12
3.1.3. Puffer und Lösungen	13
3.1.4. Proteinbestimmung	15
3.1.5. Proteinaseinhibitoren	15
3.1.6. Western Blot	15
3.1.7. Transfektion	17
3.1.7.1. Transiente Transfektion	17
3.1.7.2. Stabile Transfektion	17
3.1.7.3. Survivin-Überexpression	17
3.1.8. Geräte und Software	18
3.2. Methoden	19
3.2.1. Zellkultur	19
3.2.1.1. Kultivieren, Einfrieren und Auftauen humaner Zelllinien	19

3.2.1.2.	Stimulationsexperimente	20
3.2.2.	Durchflusszytometrie (FACScan)	21
3.2.2.1.	Apoptosemessung der Leukämie-Suspensionszellen mittels FSC/SSC	21
3.2.2.2.	Nicoletti-Färbung der adhärent wachsenden Tumorzelllinien	22
3.2.2.3.	Zellzyklusanalyse	23
3.2.2.4.	Bestimmung des Verlustes des Mitochondrienmembranpotentials mittels DiOC ₆ -Färbung	24
3.2.3.	Proteinstudien	24
3.2.3.1.	Zelllyse	24
3.2.3.2.	Kernlyse	25
3.2.3.3.	Proteinbestimmung	25
3.2.3.4.	SDS-Proteinacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
3.2.3.5.	Western Blot	26
3.2.4.	Transfektion	27
3.2.4.1.	transiente Transfektion mittels siRNA	27
3.2.4.2.	stabile Transfektion mittels shRNA Konstrukten	28
3.2.4.3.	transiente Transfektion des GFP-Survivin-Plasmids	29
3.2.5.	Cellscreen – Messung	29
3.3.	Berechnungen und statistische Analyse	30
3.3.1.	„fractional product“ Methode	30
3.3.2.	Spezifische Apoptose	31
3.3.3.	Statistische Analyse	31
4.	Ergebnisse	32
4.1.	Antagonistischer Effekt im Bezug auf die induzierte Apoptose durch die kombinierte Applikation von Doxorubicin und Vincristin	32
4.1.1.	Vermehrtes Koloniewachstum unter der Kombinationstherapie von Doxo und VCR im Vergleich zu den Einzelsubstanzen	35
4.1.2.	Ausschluss einer direkten Substanzinteraktion zwischen Doxorubicin und Vincristin	36
4.1.3.	Verminderung des Antagonismus durch zeitversetzte Applikation	38
4.1.4.	Generelle antagonistische Wechselwirkung zwischen Anthrazyklinen und Vinca-Alkaloiden	39

4.1.5.	Bestimmung der Häufigkeit der Interaktion von VCR und Doxo auf epithelialen, neuroektodermalen, hämatopoetischen und mesenchymalen Tumorzelllinien	40
4.2.	Der Vincristin-vermittelte Apoptosesignalweg und die Inhibition durch Doxorubicin	44
4.2.1.	Doxo hemmt die Phosphorylierung pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie	45
4.2.2.	Doxo hemmt den Verlust des Mitochondrienmembranpotentials	47
4.2.3.	Reduzierte Caspasen-Aktivierung durch die Kombinationstherapie mit Doxo im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit VCR	48
4.2.4.	Antiapoptotische Protein der IAP-Familie	51
4.3.	Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 in der Doxo-vermittelten Apoptosesignaltransduktion	54
4.4.	Ausgeprägter Zellzyklusarrest durch die kombinierte Stimulation mit Doxo und VCR	59
5.	Diskussion	62
5.1.	Historischer Rückblick	62
5.2.	Die antagonistische Interaktion zwischen Doxorubicin und Vincristin als neues Phänomen	62
5.3.	Mögliche Strategien, den Antagonismus zu überwinden	64
5.3.1.	Überwinden des Antagonismus durch zeitversetzte Applikation	64
5.3.2.	Chemosensitivitätstests zur Identifizierung möglicher individueller antagonistischer Effekte	65
5.4.	Kritische Punkte der Medikamenteninteraktion von Doxorubicin und Vincristin in der Apoptosesignaltransduktion	66
5.5.	Weiterführende Ergebnisse der Arbeitsgruppe	70
5.5.1.	Untermauerung der klinischen Relevanz durch Nachweis des Antagonismus bei primären Patientenzellen	70
5.5.2.	Die wichtige Bedeutung der fehlenden Phosphorylierung antiapoptotischer Bcl-2-Proteine durch die Kombinationstherapie	71
5.5.3.	Zellzyklusarrest durch andere zytostatische Chemotherapeutika als Grundlage für die antagonistische Wirkung auf die Vincristin vermittelte Apoptose	71

5.5.4.	Die Rolle des DNA-Reparatursystems in der Interaktion zwischen zytostatisch wirksamen Chemotherapeutika und Vincristin	73
5.6.	Ausblick auf weiterführende Forschungsarbeiten	73
6.	Zusammenfassung	76
7.	Literaturverzeichnis	78
8.	Danksagung	88
9.	Eidesstattliche Erklärung	89

1. Abkürzungen

A	Ampère, Einheit der elektrischen Stromstärke	Diablo	direct IAP binding protein with a low pI
AB	Antibiotika	DiOC ₆	3,3'-dihexyloxacarbocyanine Iodide
Abb.	Abbildung	DISC	death inducing singaling complex
AK	Antikörper	dh.	das heißt
ALL	akute lymphoblastische Leukämie	DMEM	Dubeco's minimum essential medium
AML	akute myeloische Leukämie	DMSO	Dimethylsulfoxid
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1	DNA	desoxyribonuclein acid
APS	Ammoniumpersulfat	Doxo	Doxorubicin
AS	Aminosäure	DR	death receptor
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	Epi	Epirubicin
Bak	Bcl-2 antagonist/killer	et al.	und andere (et alii)
Bax	Bcl-2-associated X protein	FACS	Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter)
BH	Bcl-2 homology region	FADD	Fas-associating protein with a novel death domain
bzw.	beziehungsweise	FasL	fas ligand
° C	Grad Celcius	FCS	Kälberserum (fetal calf serum)
ca.	circa	FSC/SSC	forward scatter/side scatter
Ca	Carcinom	g	gramm
CDK	cyclin dependent kinase	GFP	green fluorescent protein
Chk	Checkpoint Kinase	h	Stunde
Co	Kontrolle	IAP	inhibitor of apoptosis
DD	death domain	JNK	c-Jun N-terminal kinase
Dauno	Daunorubicin	HRP	horseradish peroxidase
DED	death effector domain		

IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
m	milli ($\times 10^{-3}$)
M	molar (1 M = 1mol/l)
max.	maximal
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MMP	Mitochondrien-Membranpotential
mol	Einheit der Stoffmenge (1 ml = 6×10^{23} Moleküle)
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
MP	Milchpulver
mRNA	messenger ribonuclein acid
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOD/SCID	non obese diabetic/severe combined immunodeficiency
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RPMI-1640	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of mean
shRNA	small hairpin ribonuclein acid
siRNA	small interfering ribonuclein acid
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
sog.	so genannte (-r/-s)
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
tBid	truncated Bid
TBS/T	TBS/Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF α	tumor necrosis factor α
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
usw.	und so weiter
V	Volt (Einheit der elektrischen Spannung)
va.	vor allem
VCR	Vincristin
VBL	Vinblastin
Vinca	Vinca-Alkaloide
VRBL	Vinorelbin
wt	wildtype
z.B.	zum Beispiel

2. Einleitung

2.1. Apoptose- der programmierte Zelltod

Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der bei vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Darunter fallen Embryonalentwicklung, Funktionen des Immunsystems und kontrollierte Entfernung unerwünschter Zellen um die normale Gewebshomöostase aufrecht zu erhalten (Kerr et al., 1972, Reed, 2000). Sind die Funktionen dieses regulierten ‚Selbstmordes‘ gestört, steht dies in direktem Zusammenhang mit Tumorwachstum und Therapieresistenz (Kerr et al., 1994).

Morphologische Veränderungen einer apoptotischen Zelle beinhalten Zytoplasma- und Zellkern-Kondensation, nukleäre DNA-Fragmentation, blasenförmige Ausstülpung der Plasmamembran und das Abschnüren kleiner Fragmente („apoptotic bodies“). Diese abgeschnürten Fragmente waren Namensgeber für den Begriff ‚Apoptose‘, aus dem Griechischen für ‚weg-/abfallen‘, da sie an fallende Blätter im Herbst erinnerten. Anschließend kommt es zur Phagozytose und die Zelle kann ohne Entzündungsreaktion aus dem Gewebe entfernt werden (Kerr et al., 1972).

2.2. Molekulare Mechanismen der Apoptose

2.2.1. Caspasen als zentrale Exekutionsorgane der Apoptose

Den morphologischen Veränderungen und biochemischen Prozessen die zur Apoptose führen, liegt die Aktivierung sog. Caspasen („Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen“) zugrunde. Diese Proteasen spalten ihre Substrate, aktivieren dadurch weitere Caspasen und verschiedene zelluläre Proteine und führen so zu einer kaskadenartigen Apoptoseinduktion. Die Caspasen können in Initiator- und Effektorcaspasen aufgeteilt werden. Sie liegen in der Zelle als inaktive Proenzyme (Zymogene) vor, bevor deren Aktivierung durch diverse Stimuli in Gang gesetzt wird. Vereinfacht gesagt gibt es zwei Hauptwege um die Apoptosesignalkaskade in Gang zu setzen. Der extrinsische, rezeptorvermittelte Weg führt über Aktivierung von Initiatorcaspase-8 zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7. Der intrinsische Weg ist Mitochondrien-abhängig und führt über Aktivierung von Initiatorcaspase-9 zur

Aktivierung der Effektorcaspasen (Dekterev et al., 2003; Hengartner, 2000; Reed, 2000).

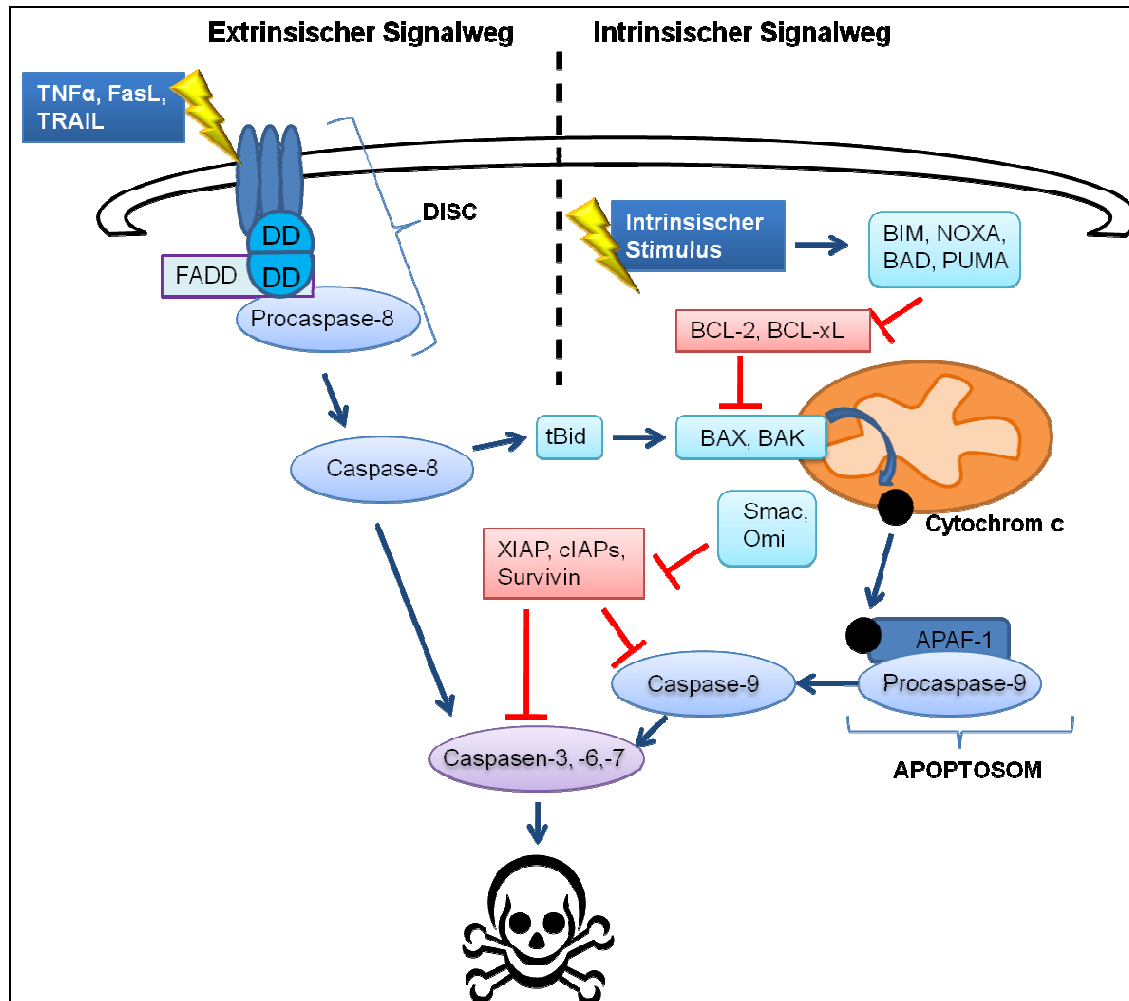


Abb. 1: Schema der intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignaltransduktion. Durch intrazelluläre Stimuli (rechts) werden BIM, BAD, PUMA und NOXA aktiviert, welche anti-apoptotisches Bcl-2 und Bcl-xL inhibieren. Dadurch wird Cytochrom-C am Mitochondrium freigesetzt und es kommt zur Formung des Apoptosoms mit APAF-1 und Caspase-9. Antiapoptotische IAP-Proteine werden durch SMAC und OMI gehemmt. Effektorcaspasen -3, -6 und -7 werden aktiviert und schließlich führt dies zur Apoptose. Extrazelluläre Stimuli führen über Todesliganden (links) zur Aktivierung von Caspase-8, welche die Effektorcaspasen (-3, -6 und -7) aktiviert. BID stellt eine Verknüpfung zur intrinsischen Signalkaskade dar.

2.2.2. Der Rezeptor-vermittelte extrinsischer Apoptosesignalweg

Der extrinsische Apoptosesignalweg wird über extrazelluläre Stimuli und membranständige Rezeptoren vermittelt. Spezifische Liganden wie TNFα (*tumor necrosis factor α*'), FasL (*fas ligand*') und TRAIL (*tumor necrosis factor related*

apoptosis-inducing ligand') binden an ihre passenden Rezeptoren und können so den Zelltod einleiten (Lee et al., 2012).

Bildung des death inducing signaling complex (DISC)

Diese Todesrezeptoren (*death receptor* = DR) sind Rezeptoren der TNF-Superfamilie, welche über eine zytoplasmatische Todesdomäne (*death domain* = DD) verfügen, die an der Signalübertragung innerhalb der Zelle beteiligt ist. Zunächst kommt es zu einer Trimerisierung von Rezeptor und Ligand und anschließend zur Bildung des sog. DISC (*death inducing signaling complex*). Dabei lagert sich das Adaptorprotein FADD (*Fas-associating protein with a novel death domain*) mit seiner DD an die DD des Rezeptors. FADD verfügt zudem noch über eine DED (*death effector domain*) über die Procaspase-8 gebunden werden kann. Anschließend kommt es zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8. Diese kann den DISC verlassen und ihre spezifischen Zielsubstrate, die Effektorcaspasen-3, -6, -7 aktivieren. (Kaufmann et al., 2012; Kischkel et al., 1995).

2.2.3. Der Mitochondrien-abhängige intrinsischer Apoptosesignalweg

Die Mitochondrien als zentrale Regulatoren

Die Mitochondrien als Energielieferanten der Zelle spielen eine wichtige Rolle in der durch intrinsische Stimuli ausgelösten Apoptosesignalkaskade. Solche intrinsische Stimuli (z.B. irreparable DNA-Schädigung durch zytotoxische Agenzien oder γ -Strahlung, unphysiologischer pH, Mangel an Wachstumsfaktoren) führen über Aktivierung proapoptotischer Proteine am Mitochondrium durch Porenbildung zur erhöhten Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran, auch als MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) bezeichnet, und geht mit dem Verlust des Mitochondrienmembranpotentials einher. Dies führt zur Freisetzung proapoptotischer Proteine die wiederum an der Caspasen-Aktivierung beteiligt sind, wie z.B. Cytochrom C (Green und Kroemer 2004; Kroemer und Reed, 2000).

Der Freisetzung von Cytochrom C kommt eine Schlüsselfunktion im Mitochondrien-abhängigen Apoptose-Prozess zu. Das aus dem Mitochondrium ins Zytosol entlassene Cytochrom C formt mit Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und Procaspase-9 einen Komplex, das sog. 'Apoptosom'. Aktive Caspase-9

wiederum spaltet und aktiviert die Effektorcaspasen-3, -6, -7 und führt so zum apoptotischen Zelltod (Green und Reed, 1998; Li et al., 1997; Zou et al., 1999).

Die Freisetzung von Cytochrom c wird begleitet durch die Freisetzung weiterer proapoptotischer Proteine, wie SMAC/Diablo (*Second mitochondria-derived activator of caspases* / *direct IAP binding protein with a low pI*) und OMI/HtrA2, die als Hemmer der antiapoptotischen IAP-Familie (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) fungieren und so deren Caspasen-Hemmung antagonisieren (Du et al., 2000; Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2000).

Pro- und antiapoptotische Regulator- Proteine der Bcl-2 Familie

Die Bcl-2-Familie besteht aus proapoptotischen und antiapoptotischen Proteinen, die sich in einer gesunden Zelle die Waage halten. Die Interaktion dieser gegensätzlichen Proteine untereinander ist entscheidend daran beteiligt, ob der Weg der Caspasenaktivierung und damit Apoptoseeinleitung eingeschlagen wird oder nicht (Cory et al., 2003). Anhand ihrer BH-Domäne (*Bcl-2 homology region*) können sie weiter klassifiziert werden. Bcl-2 und Bcl-xL sind die wichtigsten Vertreter der antiapoptotischen Proteine mit 4 BH-Domänen (BH1234). Bax (*Bcl-2-associated X protein*) und Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) als proapoptotische Proteine mit 3 BH-Domänen (BH123) lassen sich von Bid, Bad, NOXA und PUMA abgrenzen, die als *BH-3 only* Proteine bezeichnet werden (Letai et al., 2002).

Die proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie spielen eine zentrale Rolle beim Verlust der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran (*MOMP*). In gesunden Zellen ist Bak (über Bcl-2) an die äußere Mitochondrienmembran gebunden. Im Gegensatz dazu liegt Bax in seiner inaktiven Form im Zytosol vor und diffundiert erst nach Apoptoseinduktion zur äußeren Mitochondrienmembran (Wolter et al., 1997). Nach Konformationsänderung und fester Assoziation mit der Mitochondrienmembran können Bax und Bak als Multimere Protein-durchlässige Poren formen (Matsuyama et al., 1998) und führen so zur Cytochrom-C-Freisetzung und Aktivierung der Caspasen-abhängigen Apoptosesignalkaskade. Proapoptotische BH3-only Proteine können als ‚Aktivatoren‘ oder ‚Unterstützer‘ fungieren (Kroemer et al., 2007).

Bid stellt eine Querverbindung von extrinsischem zu intrinsischem Apoptoseweg dar. Über den rezeptorvermittelten extrinsischen Signalweg kommt es über Initiatorcaspase-8 durch Spaltung zur Aktivierung von Bid zu tBid (*truncated Bid*).

tBid aktiviert die proapoptotischen Proteine Bax und Bak. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und somit zu einer Apoptose-Verstärkung (Kaufmann et al., 2012; Korsmeyer et al., 2000).

NOXA (*lat.* ‚Schaden‘) und PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) zählen ebenfalls zu den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Sie entfalten ihre Wirkung hauptsächlich durch Interaktion mit antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie und ebnen so den Weg zur Apoptoseinduktion (Oda et al., 2000; Yee und Voutsden, 2008). PUMA kann darüber hinaus durch direkte Interaktion mit Bax zu einer verstärkten Apoptoseaktivierung führen (Yingjie et al., 2009).

Die wichtigsten antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie sind Bcl-2 und Bcl-xL. Diese entfalten ihre antiapoptotische Wirkung indem sie die Freisetzung von Cytochrom C direkt am Mitochondrium verhindern (Kroemer und Reed, 2000). Somit bleibt die Bildung des Apoptosoms aus und Caspase-9 kann nicht aktiviert werden. Durch Phosphorylierung, z.B. über Mikrotubuli-Schädigung kann die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 und Bcl-xL antagonisiert werden (Blagosklonny et al., 1997, Poruchynsky et al., 1998).

Antiapoptotische Proteine der IAP-Familie

Die Proteine der IAP-Familie (cIAP1, cIAP2, XIAP, Survivin) entwickeln ihren antiapoptotischen Effekt, indem sie distal des Mitochondriums in die Signalkaskade eingreifen. Über direkte Interaktion mit Caspasen, vor allem der Caspasen -3, -7 und -9, kommt es zu deren Inaktivierung (Deveraux et al., Roy et al., 1997, 1998, Tamm et al., 1998).

Survivin nimmt in der IAP-Familie eine Sonderrolle ein. Dieses Protein wird bei einem hohen Prozentsatz der häufigsten Tumor- und Lymphomzellen überexprimiert, ist jedoch im normalen adulten Gewebe nicht detektierbar (Ambrosini et al., 1997) und legt daher nahe, dass Survivin eine wichtige Rolle in der Pathogenese menschlicher Tumoren einnimmt (Ambrosini et al., 1998).

2.2.4. Die pro-apoptotische Funktion von JNK (c-Jun N-terminal Kinase) im extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg

JNK (c-Jun N-terminal Kinase) gehört zur Familie der MAP-Kinasen und spielt als zentraler Regulator sowohl im extrinsischen als auch im intrinsischen Apoptosesignalweg eine wichtige Rolle. Via Translokation zum Nucleus und Phosphorylierung von c-Jun kommt es zur vermehrten Transkription pro-apoptotischer Proteine einerseits und über direkte Phosphorylierung zur Modulation pro- und anti-apoptotischer Proteine am Mitochondrium andererseits (Dhanasekaran und Reddy, 2008). Über die Phosphorylierung von pro-apoptotischem Bim und Bad bzw. über direkte Phosphorylierung und Inaktivierung von anti-apoptotischem Bcl-2 und Bcl-xL führt JNK letztlich zur Freisetzung von Cytochrom C (Dhanasekaran und Reddy, 2008, Herr und Debatin, 2001). Zudem kommt es durch JNK zu einer direkten Aktivierung des porenformenden und pro-apoptotischen Proteins Bax (Tsuruta et al., 2004). Die Cytochrom-C-Freisetzung am Mitochondrium stellt den entscheidenden Schritt des intrinsischen Apoptosesignalweges dar (Kapitel 2.2.3).

Während der extrinsischen Apoptosesignaltransduktion kommt es nach Aktivierung von Caspase 8 als Querverbindung zum intrinsischen Weg zur Spaltung von Bid (sog. tBid) (Kapitel 2.2.3). Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung von JNK kann zu einer Caspase-8-unabhängigen Spaltung von Bid zu jBid führen, welches durch Freisetzung von SMAC/Diablo und konsekutiver Hemmung von anti-apoptotischen Proteinen der IAP-Familie zum apoptotischen Zelltod führt (Deng et al., 2003).

JNK führt zudem über die Phosphorylierung von p53 zur Aktivierung der Apoptosesignalkaskade (Oleinik et al., 2007).

Abbildung 2 zeigt einen Überblick über die Signaltransduktion von JNK.

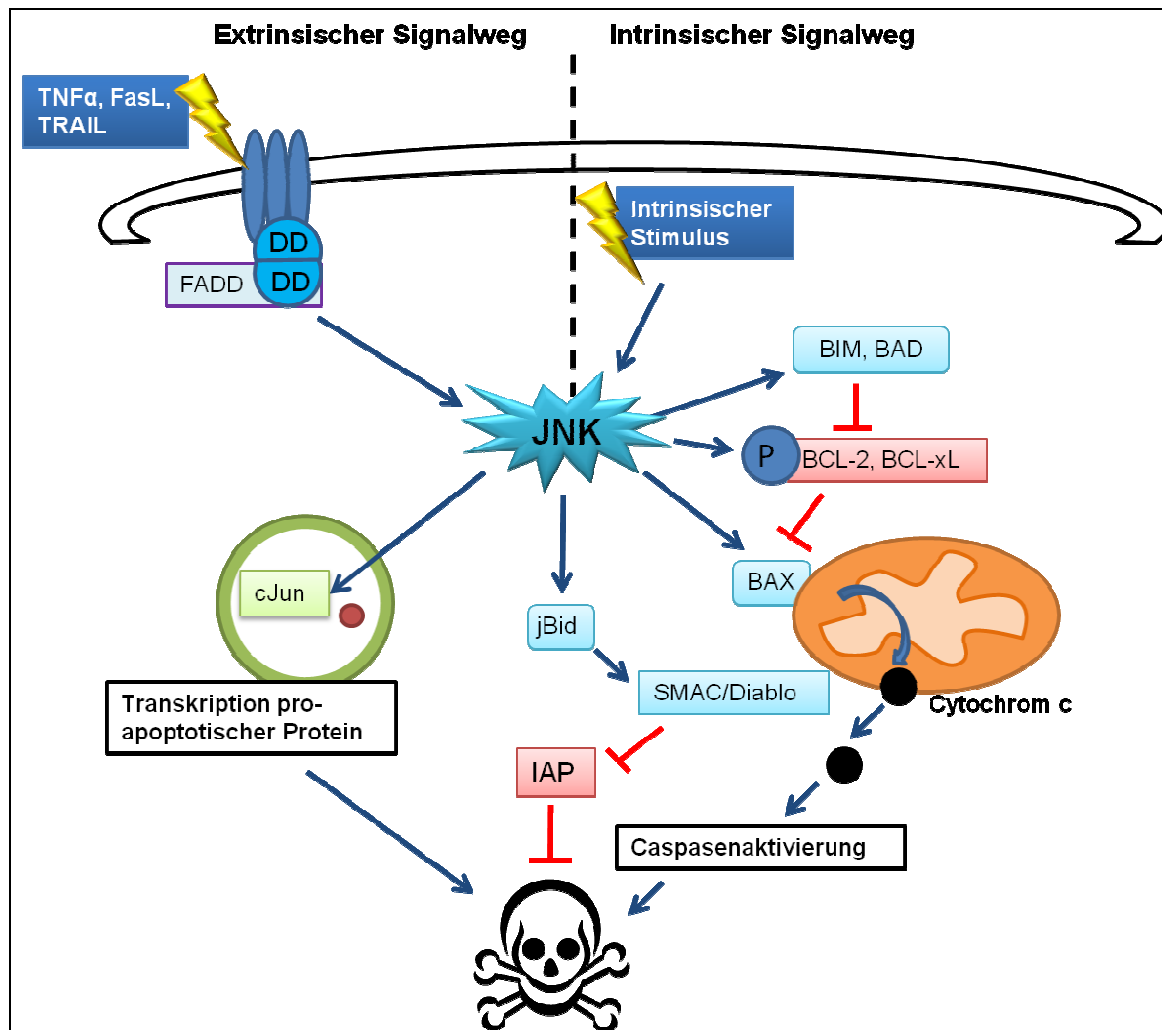


Abb. 2: Schema JNK-vermittelten Apoptosesignaltransduktion. Intrazelluläre Stimuli (rechts) führen zur Aktivierung von JNK, wodurch Bcl-2 und Bcl-xL phosphoryliert und damit deren antiapoptotische Funktion inhibiert wird. Zudem kommt es über JNK zur Aktivierung von BIM, BAD, welche ihrerseits anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie inhibieren. Zudem wird BAX von JNK aktiviert. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom-C am Mitochondrium und über Caspasenaktivierung zum apoptotischen Zelltod. Extrazelluläre Stimuli führen über Todesliganden (links) zur Aktivierung von JNK, welches über die Aktivierung von jBid und SMAC/Diablo antiapoptotische IAP-Proteine hemmt. Durch Translokation zum Nucleus wird über die Aktivierung von cJun die Transkription pro-apoptotischer Proteine verstärkt.

2.2.5. Die verschiedenen Funktionen des Tumorsuppressors p53

Eines der am besten erforschten Apoptoseproteine und Tumorsuppressoren ist Transkriptionsfaktor p53. Seine Rolle in einer gesunden Zelle besteht in der Aufrechterhaltung normaler Gewebshomöostase und beinhaltet unter anderem Zellzyklus-Arrest, DNA-Reparatur und Apoptose als Antwort auf zellulären Stress wie

DNA-Schaden oder Hypoxie (Hussain und Harris, 1998, Vogelstein et al., 2000). Im DNA-Reparatur-System der Zelle hat p53 als „Wächter des Genomes“ (Lane, 1992) also die Funktion den Zellzyklus zu unterbrechen um die Proliferation entarteter Zellen zu verhindern. Dies ermöglicht der Zelle vorhandenen DNA-Schaden zu reparieren oder anderenfalls die Apoptose-Induktion einzuleiten (Suzuki und Matsubara, 2011).

Dies erklärt auch die Tatsache, dass p53 das bei Tumoren am häufigsten inaktivierte bzw. mutierte Tumorsuppressor-Gen darstellt (Vogelstein et al., 2000).

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der selektiv an DNA binden kann und die Fähigkeit besitzt die Transkription von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie zu kontrollieren. Dazu gehören Bax (Miyashita et al., 1994), PUMA (Nakano und Vousden, 2001), Noxa (Oda et al., 2000) und Bid (Sax et al., 2002).

Neben der Transkriptionsinduktion von Bcl-2-Gegenspielern, wirkt p53 zudem proapoptotisch, indem es die Bcl-2-Transkription unterdrückt (Miyashita et al., 1994). Auch eine direkte Transkriptions-unabhängige Interaktion von p53 mit pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie ist möglich, indem zytoplasmatisches p53 direkt mit diesen Proteinen interagiert und zur Aktivierung der Apoptose-Kaskade führt (Moll et al., 2005).

Zu den wenigen bisher bekannten Zielgenen, deren Transkription durch p53 unterdrückt wird gehört auch Survivin aus der Familie der antiapoptotischen Proteine (Hoffman et al, 2002).

p53 entfaltet seine Wirkung nicht nur über direkte Apoptose-Induktion, sondern auch, indem es zum Zellzyklus-Arrest führt. Über die Aktivierung der Transkription von p21, einem CDK (*cyclin dependent kinase*)-Inhibitor, induziert p53 einen Arrest in G1 (Giono und Manfredi, 2006). Darüber hinaus reguliert p53 die G2/M-Transition und kann zu Zellzyklusarrest in G2/M führen (Suzuki und Matsubara, 2011).

2.3. Chemotherapeutika in der Tumorthherapie

Vereinfacht gesagt liegt der Entstehung von Tumoren entweder eine übermäßige Proliferation oder ein Defekt der Zellen im Apoptosemechanismus zugrunde. Heute etablierte Chemotherapeutika wirken anti-proliferativ und induzieren den

Apoptoseprozess der Tumorzellen. Sie können je nach Angriffspunkt in der Zelle in verschiedene Untergruppen aufgeteilt werden. Zum einen DNA-schädigende Substanzen (z.B. Cyclophosphamid, Cisplatin, Doxorubicin), Antimetabolite (z.B. Methotrexat, 5-Fluorouracil), Mitosehemmer (z.B. Vincristin), Nukleotidanaloga (6-Mercaptopurinol) oder Topoisomerasehemmer (z.B. Etoposid) (Herr und Debatin, 2001). Des Weiteren kann zwischen zytotoxisch und zytostatisch wirksamen Chemotherapeutika unterschieden werden. Zytotoxische Substanzen haben das Ziel, die Tumorzelle abzutöten. Dazu gehören Spindelgifte wie Vincristin oder Antimetabolite der DNA-/RNA- oder Proteinbiosynthese, welche über DNA-Schädigung zu verschiedenen Zeitpunkten des aktiven Zellzyklus zum apoptotischen Zelltod führen (Mauro und Madoc-Jones, 1970). Zytostatisch bedeutet im eigentlichen Sinn, dass die Zelle nicht abgetötet wird, sondern die Proliferation angehalten wird (Rixe und Fojo, 2007). Zu den Substanzen, welche laut dieser Definition zytostatisch wirken, da sie den Zellzyklus arretieren, gehört zum Beispiel Doxorubicin (Lüperitz et al., 2010).

Um die Effektivität der antineoplastischen Therapie zu steigern, werden heute die Chemotherapeutika nicht einzeln, sondern im Rahmen sog. Polychemotherapieprotokolle simultan verabreicht. Ursprünglich hatte die Kombinationstherapie das Ziel die Entstehung von Chemotherapeutika-Resistenzen zu verhindern. Bevor die Polychemotherapie übliche Praxis wurde war die Remission nach Therapie mit Einzelsubstanzen nur von kurzer Dauer und auf wenige Tumorentitäten beschränkt (Dy und Adjei, 2008). In den ersten empirischen Studien zur Kombinationstherapie bei kindlicher akuter Leukämie konnte die Remissionsrate durch die Kombination von Prednison und Vincristin von 20-50% auf 80-90% gesteigert werden. Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage dafür die Kombinationstherapie um weitere Substanzen (zunächst Asparaginase und /oder Anthrazykline) zu erweitern. Damit konnten weitere Erfolge von Remissionsraten bis zu 100% erzielt werden (Frei, 1985). Bisher wurden kaum systematische Untersuchungen zur Optimierung dieser Substanzkombinationen durchgeführt. Zudem sind die genauen Wirkmechanismen vieler Substanzen und vor allem deren Kombination noch unzureichend verstanden (Akutsu et al, 2002, Bendall, 2011, Benz et al., 2007).

2.3.1. Die pro-apoptotische Wirkung von Vincristin

Vincristin gehört zur Gruppe der natürlich vorkommenden Vinca-Alkaloide und wird aus den Blättern der aus Madagaskar stammenden „rosafarbenen Catharanthe“ (Syn. *Vinca rosea*) gewonnen (Gidding et al., 1999).

Der Zellzyklus besteht aus *G0/G1-Phase* (Ruhephase, in der sich die meisten lebenden Zellen befinden), der *S-Phase* (Synthesephase, in der sich der Chromatingehalt verdoppelt), der *G2-Phase* (Prämitose, in der sich die Zelle auf die bevorstehende Teilung vorbereitet) und schließlich der *M-Phase* (Mitose, in der sich die Zelle teilt). Durch Interaktion mit Mikrotubuli, welche für die Ausbildung des Spindelapparates im Rahmen der Zellteilung wichtig sind, hemmt Vincristin die Zellproliferation in der Mitose (Mollinedo und Gajate, 2003). Darüber hinaus führt die Behandlung mit Vincristin zu einer Phosphorylierung von Kinasen wie JNK, sowie zu einer Phosphorylierung und damit Inaktivierung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL (Blagosklonny et al., 1997, Poruchynsky et al., 1998). Durch Stabilisierung von p53 kann es unter bestimmten Bedingungen auch zur Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen kommen (Giannakakou et al., 2002).

2.3.2. Die pro-apoptotische Wirkung von Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Anthrazyklin, welches in den 1960er Jahren ursprünglich als Antibiotikum aus *Streptomyces peucetius* isoliert wurde (Minotti et al., 2004). Zur Wirkungsweise von Doxorubicin gehören DNA-Interkalation und -Alkylierung, freie Radikal-Bildung, Topoisomerase II-Hemmung (Gerwitz, 1999). Die Hemmung der Topoisomerase II führt zum Zellzyklusarrest in G1 und G2 (Perego et al., 2001). Wie bei anderen zytotoxischen Substanzen spielt p53 eine wichtige Rolle in der Doxorubicin-vermittelten Apoptose (Minotti et al., 2004). Durch die Aktivierung von p53 und auch p21 kommt es durch die Behandlung mit Doxorubicin zum Zellzyklusarrest in G2/M (Lüperitz et al., 2010).

2.3.3. Vinca-Alkaloide und Anthrazykline als Kombinationstherapie

Vinca-Alkaloide und Anthrazykline sind seit ca. 40 Jahren eine etablierte Kombinationstherapie in vielen Chemotherapieprotokollen, insbesondere in der pädiatrischen Onkologie. Tumoren wie Nephroblastome, Neuroblastome, Ewing Sarkome, sowie Leukämien oder Lymphome werden mit dieser Kombination meist

am selben Tag behandelt. Zurückzuführen ist die Etablierung dieser Chemotherapie-Kombination auf Experimente in den 1970er Jahren (Goldin und Johnson, 1975, Zeller et al., 1979). Seither wurden keine klinischen Studien zur Optimierung des Applikationsschemas durchgeführt (Frei, 1974, Frei, 1985), obwohl von anderen Chemotherapie-Kombinationen bekannt ist, dass die Effektivität entscheidend von einem optimalen Applikations-Zeitplan abhängt (Akutsu et al., 2002).

2.4. Ziel der Arbeit

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatte sich entgegen der Erwartungen gezeigt, dass die Kombination der beiden Chemotherapeutika Vincristin (VCR) und Doxorubicin (Doxo) auf CEM und Jurkat Leukämie-Zelllinien entgegen des zu erwarteten Synergismus bei gleichzeitiger Applikation zu einer reduzierten Apoptoseinduktion im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Vincristin führt. Der antagonistische Effekt von Doxorubicin auf die Vincristin-induzierte Apoptose war dadurch gekennzeichnet, dass Doxo selbst nur wenig Apoptose induzierte, aber die potente Apoptose-induzierende Kapazität von VCR massiv eingeschränkt war (Ehrhardt et al., 2011).

Ziel meiner Dissertation war es, die Interaktion von Vincristin (VCR) und Doxorubicin (Doxo) *in vitro* weiter zu untersuchen und 1.) die Häufigkeit des Auftretens von Antagonismus bei dieser Kombinationstherapie zu bestimmen und 2.) den zugrundeliegenden Mechanismus der Interaktion der beiden Substanzen zu charakterisieren. Um die klinische Relevanz weiter zu untermauern, sollte ermittelt werden auf wie vielen weiteren Tumor-Zelllinien und bei welchen Tumorentitäten der Antagonismus zusätzlich nachgewiesen werden kann.

Um die Interaktion auf mechanistischer Ebene zu klären, war es notwendig, zu untersuchen, auf welcher Ebene Doxo die VCR-induzierte Apoptose inhibiert und welche Signalwegsaktivierung zu der Inhibition der Apoptoseinduktion führt. Hierzu wurden die verschiedenen Signalwege und Proteine der Apoptose-Signalkaskade und deren Aktivierung durch die Einzelsubstanzen und die Kombinationstherapien untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Zellkultur

Medien und Zusätze

<i>DMEM</i>	Kulturmedium (Gibco, San Diego, USA)
<i>ITS</i>	Insulin-Transferrin-Selenium, 100x (Gibco, San Diego, USA)
<i>RPMI 16 40</i>	Kulturmedium mit Glutamin (Gibco, San Diego, USA)
<i>Trypsin</i>	0,5% Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, D)
<i>FCS</i>	1h bei 56 °C hitzeinaktiviert (Pan Biotech, Aidenbach, D)

Antibiotika

<i>Ampicillin</i>	25 mg/ml in H ₂ O, sterilisiert (Sigma, Deisenhof, D)
<i>Geneticin</i>	50 mg/ml (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
<i>Gentamycin</i>	10 mg/ml (Biochrom AG, Berlin, D)
<i>Penicillin/ Streptomycin</i>	10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin (Gibco)
<i>Puromycin</i>	10 mg/ml (Sigma, Deisenhof, D)

Zellkulturflaschen und -Platten

<i>Zellkulturflaschen 75 cm² mit Filter</i>	Greiner Bio-ONE (Frickenhausen, D)
<i>BioCoat™ Kollagen I Zellkulturflaschen</i>	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
<i>75 cm² mit Filter</i>	
<i>Falcon™ Multiwell-Zellkulturplatten</i>	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
<i>BioCoat™ Kollagen I Zellkulturplatten</i>	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)

3.1.2. Zytostatika und Stimulanzen

<i>Daunorubicin</i> (1 mg/ml)	Calbiochem , Darmstadt, D
<i>Doxorubicin</i> (1 mg/ml in Ethanol)	Sigma, Deisenhof, D
<i>Epirubicin</i> (2 mg/ml)	Hexal , Holzkirchen, D
<i>Vinblastin</i> (10 mg/ml)	Calbiochem , Darmstadt, D
<i>Vincristin</i> (20 mg/ml)	Calbiochem, Darmstadt, D
<i>Vinorelbin</i> (10 mg/ml)	Calbiochem , Darmstadt, D

3.1.3. Puffer und Lösungen

Puffer Kern A (pH 7,0 mit KOH einstellen)

98,25 ml	aqua ad inj.
1 ml	Hepes 1 M
100 µl	KCL 1 M
150 µl	MgCl ₂ 1 M
500 µl	Triton X 100

Puffer Kern B (pH 7,9 mit KOH einstellen)

13 ml	aqua ad inj.
2 ml	Hepes 1 M
40 ml	KCl 1 M
20 ml	EDTA 0,5 M
25 ml	Glyzerin 100%

Gel-Puffer A (pH 8,9)

36,3 g	TRIS Base (3 M)
4,8 ml	N HCL
	ad 100 ml H ₂ O

Gel-Puffer B (pH 6,7)

5,7 g	TRIS Base (0,47 M)
25,6 ml	1 M Phosphorsäure
	ad 100 ml H ₂ O

Lämmli-Puffer 5x

16,7 g	Tris 1 M (pH 6,8)
33,3 ml	SDS 20%
33,3 ml	Glyzerin 100%
1 Spatelspitze	Bromphenolblau
	ad 100 ml H ₂ O

SDS-Laufpuffer

15,1 g	Tris Base
94 g	Glycine
50 ml	SDS 10%
	ad 1 l H ₂ O

Gel-Transferpuffer

3 g	Tris Base
14,2 g	Glycin
158 ml	Methanol
	ad 1 l H ₂ O

Stripping-Puffer

178,42 ml	Tris-HCl 0,5 M (pH 6,5)
20 ml	SDS 20%
1580 µl	β-Mercaptoethanol (60 mM)

Nicoletti Puffer

1 g	Triton-X 100
1 g	Natrium-Citrat
	ad 1 l H ₂ O

TBS 10x (pH 6,8)

24,2 g	TRIS Base
80 g	NaCl
	ad 1 l H ₂ O

TBS/T 0,1%

100 µl	Tween 20
100 ml	TBS

PBS 10x (pH7,3)

80 g	NaCl
2 g	KCl
14,4 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
0,4 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1 l H ₂ O

DiOC₆

Sigma (Deisenhof, D)

3.1.4. Proteinbestimmung

<i>BCA micro kit</i>	Pierce Perbio Science (Bonn, D)
<i>BSA</i>	Sigma (Deisenhof, D)

3.1.5. Proteaseinhibitor für Zelllysate

*als Cocktail (AEBSF, PepstatinA, E-64, Bestatin,
Leupeptin und Aprotinin)*

Sigma (Deisenhof, D)

3.1.6. Western Blot

<i>Entwickler/Fixierer</i>	Ernst Christiansen GmbH (München, D)
<i>ECL-Substrat</i>	SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Pierce/Thermo Scientific)
<i>Milchpulver</i>	Roth (Karlsruhe, D)
<i>PVDF- (Polyvinylidenfluorid-) Membran</i>	Millipore (Bedford, USA)
<i>Rainbow-Marker</i>	Biorad (München, D)
<i>Tween 20</i>	Sigma (Deisenhof, D)
<i>Whatman-Filterpapier</i>	Biorad (München, D)

Gele für Western Blot

Trenngel 12% (30ml, 4 Gele)

12 ml	30% Acrylamide Mix (Rotiphorese Gel 30) (Roth, Karlsruhe, D)
9,9 ml	H ₂ O
7,5 ml	Puffer A

300 µl	SDS 20%
300 µl	APS 10%
12 µl	TEMED (Roth, Karlsruhe, D)

Sammelgel (5ml)

0,83 ml	30% Acrylamide Mix (Roth, Karlsruhe, D)
3,4 ml	H ₂ O
0,63 ml	Puffer A
50 µl	SDS 20%
50 µl	APS 10%
6 µl	TEMED (Roth, Karlsruhe, D)

Antikörper für Western Blot

Tab. 1.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<i>Bak</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Santa Cruz
<i>Bax</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Santa Cruz
<i>Bcl-2</i>	mouse	1:2500 in TBST/T	Santa Cruz
<i>Bcl-xL</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T	Santa Cruz
<i>Bid</i>	rabbit	1:1000 in TBST/T + 5% MP	Trevigen inc.
<i>Bim</i>	rat	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Alexis Bioch.
<i>cleaved Caspase-2</i>	mouse	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Cell Signaling
<i>cleaved Caspase-3</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Cell Signaling
<i>cleaved Caspase-6</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Cell Signaling
<i>cleaved Caspase-7</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Cell Signaling
<i>cleaved Caspase-8</i>	mouse	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Alexis Corp.
<i>cleaved Caspase-9</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Transduction
<i>cleaved Caspase-10</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	MBL
<i>cIAP-1</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Cell Signaling
<i>cIAP-2</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Santa Cruz
<i>Histon H1</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Santa Cruz
<i>JNK</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T	Cell Signaling
<i>p-JNK</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T	Cell Signaling

<i>NFκB p65</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T	Cell Signaling
<i>NFκB p100</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T	Cell Signaling
<i>p21</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T	Santa Cruz
<i>p53</i>	mouse	1:5000 in TBST/T	Santa Cruz
<i>cleaved PARP</i>	rabbit	1:2500 in TBST/T + 5% MP	Cell Signaling
<i>survivin</i>	mouse	1:1000 in TBST/T + 5% MP	Cell Signaling
<i>α-Tubulin</i>	mouse	1:5000 in TBST/T	Oncogene
<i>XIAP</i>	rabbit	1:1000 in TBST/T + 5% MP	Cell Signaling

Tab. 1.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti mouse HRP	goat IgG	1:5000 in TBS/T	Thermo-Fisher
Anti rabbit HRP	goat IgG	1:5000 in TBS/T	Cell Signaling
Anti rat HRP	goat IgG	1:2500 in TBS/T + 5% MP	Calbiochem

3.1.7. Transfektion

Lipofectamine™ 2000 Reagent Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA)

Lipofectamine Reagent Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA)

3.1.7.1. Transiente Transfektion

siRNA p53: 5'-GGG UUA GUU UAC AAU CAG C-3' (Ambion, Austin Texas, USA)

All Star negative control siRNA Qiagen (Hilden, D)

3.1.7.2. Stabile Transfektion

shRNA p53: 5'-GGG TTA GTT TAC AAT CAG C-3' , Vektor *pRetro* mit Resistenz gegen Puromycin (Brummelkamp et al., 2002)

scrambled p53 als Kontrolle: 5'-CGG TGA TCT CCA GAG TAT G-3'

3.1.7.3. Survivin-Überexpression

GFP-Kontroll-Vektor pEGFPc1 (Li et al., 1999)

Survivin-GFP-Fusionsprotein pEGFPc1-surv (Li et al., 1999)

3.1.8. Geräte und Software

Geräte

<i>Blotter</i>	Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell (Biorad, München, D)
<i>Cellscreen</i>	Innovatis AG (Bielefeld, D)
<i>Durchflusszytometer</i>	FACScan (BD Biosciences, Heidelberg, D)
<i>Elektrophorese (SDS-Page)</i>	Mini-PROTEAN 3 Electrophorese System (Biorad, München, D)
<i>Filme</i>	Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
<i>Filmentwicklungsmaschine</i>	CP 1000 Processor (Agfa HealthCare, Köln, D)
<i>Filmkassette</i>	X-Ray Casette IEC 60406 (DsKar Health Care, China)
<i>Heizblock</i>	TS-100 Thermo Shaker (BioSan, Riga, Lettland)
<i>Kippschüttler</i>	Rocking Platform Model 200 (VWR, Darmstadt, D)
<i>Magnetrührer</i>	MR 3001K (Heidolph Instruments, Nürnberg, D)
<i>Lichtmikroskop</i>	Carl Zeiss 550 1317 (Zeiss, Jena, D)
<i>Pipetten</i>	epReference Pack (Eppendorf, Hamburg, D)
<i>Pipettierhilfe</i>	Pipetboy (Integra Biosciences, Vancouver, Kanada)
<i>Schüttelinkubator</i>	Innova 4400 (New Brunswick Scientific, Edison,USA)
<i>Sterilbank</i>	Herasafe HS12 und HS18 (Heraeus)
<i>Ultraschallgerät</i>	Branson Digital Sonifier, Model 250 D (Fa.Branson,Danbury,USA)
<i>Vortexgerät</i>	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
<i>Waagen</i>	
<i>Feststoffe</i>	440-43N (Kern&Sohn, Balingen, D)
<i>Feinwaage</i>	Sartorius 2001 MP2 (Sartorius AG, Göttingen, D)
<i>Wasserbaderhitzer</i>	WB14 mit Schrägdeckel (Mettler, Schwabach, D)
<i>Zentrifugen</i>	5417C und 5417R (Eppendorf, Hamburg, D)

Software

<i>CellQuestPro</i>	FACScan-Auswertung
<i>Microsoft-Office Excel 2007</i>	graphische Darstellung
<i>Microsoft-Office Powerpoint 2007</i>	graphische Darstellung
<i>SigmaStat 4.0</i>	statistische Analyse

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Kultivieren, Einfrieren und Auftauen humaner Zelllinien

Alle humanen Zelllinien (gelistet in Tab.2.1 und 2.2) wurden von DSMZ (Braunschweig, D) bezogen. HCT 116 p53 +/+, p53 -/- und p21-/- wurden von B. Vogelstein zur Verfügung gestellt. p53 und p21 wurden von dieser Arbeitsgruppe per homologer Rekombination ausgeschaltet (Bunz et al., 1998).

Die Zellen wurden, wie in Tabelle 2.1 beschrieben, in DMEM- oder RPMI-Nährmedium in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei den adhärenenten Zelllinien CADO und Calu-6 wurden kollagenbeschichtete Kulturflaschen verwendet, bei allen anderen Plastik-Zellkulturflaschen ohne Beschichtung mit Filter.

Zur Verdünnung erfolgte alle 48 bis 72 Stunden ein sog. ‚Passagieren‘ der Zellen. Dazu wurden die adhärenenten Zellen mittels Trypsin-EDTA (0,5%) aus dem Monolayer herausgelöst und nach Verdünnung im Verhältnis 1:3 - 1:6 in eine neue Kulturflasche überführt. Zur Aufbewahrung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Dazu erfolgte die Suspension von bis zu 5×10^6 Zellen in FCS mit 10% DMSO, um diese dann anschließend tiefzufrieren. Wurden die Zellen erneut benötigt, so erfolgte das Auftauen im Wasserbad bei 37°C. Nach Zugabe von 5 ml Kulturmedium erfolgte das Abzentrifugieren (1000 U/min, 5 min) und die Aufnahme der Zellen in 10 ml Kulturmedium und Überführung in eine Kulturflasche.

Tab. 2.1 Adhärenente Zelllinien mit Bezeichnung, Zelltyp und Kulturmedium

Bezeichnung	Zelltyp	Kulturmedium
<i>A-498</i>	Nieren-Ca	RPMI + 10% FCS
<i>A-549</i>	Lungen-Ca	DMEM + 10% FCS
<i>CADO</i>	Ewing-Sarkom	RPMI + 10% FCS
<i>Calu-6</i>	Lungen-Ca	DMEM + 10% FCS
<i>H1299</i>	Lungen-Ca	RPMI + 10% FCS

<i>HCT 116 p53 +/+ wt</i>	Colon-Ca	RPMI + 10% FCS
<i>HCT 116 p53 -/-</i>	Colon-Ca	RPMI + 10% FCS
<i>HCT 116 p21 -/-</i>	Colon-Ca	RPMI + 10% FCS
<i>HELA</i>	Cervix-Ca	RPMI + 10% FCS
<i>HT29</i>	Colon-Ca	RPMI + 10% FCS
<i>LnCap</i>	Prostata-Ca	RPMI + 10% FCS
<i>MCF-7</i>	Mamma-Ca	RPMI + 10% FCS
<i>MDA-MB435</i>	Mamma-Ca	DMEM + 10% FCS
<i>Panc-Tul</i>	Colon-Ca	RPMI +10% FCS
<i>RD</i>	Ewing-Sarkom	DMEM +10% FCS
<i>RH30</i>	Rhabdomyosarkom	RPMI +10% FCS
<i>RMS13</i>	Rhabdomyosarkom	RPMI +10% FCS
<i>SHEP</i>	Neuroblastom	RPMI +10% FCS

Tab. 2.2. Zelllinien in Suspensionskultur mit Bezeichnung, Zelltyp und Kulturmedium

Bezeichnung	Zelltyp	Kulturmedium
<i>BJAB</i>	B-ALL	RPMI + 10% FCS
<i>BOE</i>	B-ALL	RPMI + 10% FCS
<i>HL-60</i>	AML	RPMI + 10% FCS
<i>Hut78</i>	T-ALL	RPMI + 10% FCS
<i>KMH2</i>	Hodgkin-Lymphom	RPMI + 10% FCS
<i>L428</i>	Hodgkin-Lymphom	RPMI + 10% FCS
<i>Nalm-6</i>	B-ALL	RPMI + 10% FCS
<i>SKW-6</i>	T-ALL	RPMI + 10% FCS
<i>THP-1</i>	AML	RPMI + 10% FCS

3.2.1.2. Stimulationsexperimente

Die adhärenenten Zellen wurden nach Ablösen mittels Trypsin-EDTA (5%) mit einer Dichte von 50000 Zellen pro ml Kulturmedium in einer 24-well-Platte ausgesät (1ml/well) und im Brutschrank bei 37°C für 24h vorinkubiert. Die suspensiven Zellen wurden mit einer Dichte von 250000 Zellen pro ml in einer 96-well-Platte ausgesät (100µl/well) und für eine Stunde im Brutschrank vorinkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit den jeweiligen Zytostatika bzw. den Kombinationen stimuliert.

Die Dosierungen der Stimulanzien, welche für die Experimente verwendet wurden, wurden so gewählt, dass sie die im Serum erreichten Spitzenwerte nicht übersteigen.

Diese sogenannten ‚Peak-Plasma Konzentrationen‘ der verwendeten Chemotherapeutika sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die Zytostatika wurden in Aliquots bei -80° C gelagert, für die Experimente bei Raumtemperatur aufgetaut und gegebenenfalls mit PBS verdünnt.

Nach Stimulation wurden die Zellen für verschiedene Zeitspannen bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Apoptose-Messung erfolgte mit der Färbung nach Nicoletti mittels FACScan.

Tab. 3: Peak-Plasma-Konzentration der verwendeten Chemotherapeutika

Chemotherapeutikum	Peak-Plasma-Konzentration	Literatur
Vincristin	100 - 400 ng/ml	Estlin et al, 2000
Vinblastin	0,4 µM	Rahmani und Zou, 1993
Vinorelbin	0,4 µM	Rahmani und Zou, 1993
Daunorubicin	227 ng/ml	Estlin et al., 2000
Doxorubicin	22,3 - 334 ng/ml	Frosr et al., 2002
Epirubicin	171 – 404 ng/ml	Eksborg, 1989

Für Stimulationsexperimente mit Mediumwechsel wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und nach 24 h Vorinkubation im Brutschrank mit dem ersten Zytostatikum stimuliert. Vor Zugabe des zweiten Zytostatikums wurde das Kulturmedium abgenommen, verworfen und durch frisches ersetzt. Bei der Erststimulation mit Doxorubicin erfolgte nach 24 Stunden die Zugabe des zweiten Chemotherapeutikums (Vincristin). Bei Vincristin als Erststimulanz erfolgte die Zugabe von Doxorubicin nach 12 Stunden.

3.2.2. Durchflusszytometrie (FACScan)

3.2.2.1. Apoptosemessung der Leukämie-Suspensionszellen mittels FSC/SSC

Stirbt eine Zelle durch Apoptose kommt es zu morphologischen Veränderungen wie Volumenabnahme, Zunahme der Granularität, und Abschnürung kleiner Fragmente (Kerr et al., 1972). Diese morphologischen Veränderungen dienen bei der Durchflusszytometrie (FACScan) dazu, die lebenden Zellen von den apoptotischen Zellen durch Messung der Zellgröße und –granularität abzugrenzen.

Zur Quantifizierung des Anteiles apoptotischer Zellen wurden jeweils 1000-5000 Zellen gezählt. Die Apoptosemessung erfolgte mittels Forwardside Scatter-Analyse (FSC/SSC). In der Forwardside Scatter-Analyse (Vorwärtsstreulicht (*FSC = forward scatter*) gegen Seitwärtsstreulicht (*SSC = side scatter*)) stellten sich die apoptotischen Zellen kleiner (FCS) und granulärer (SSC) dar und konnten so von den lebenden Zellen abgegrenzt und der prozentuale Anteil bestimmt werden (Abb.3.1).

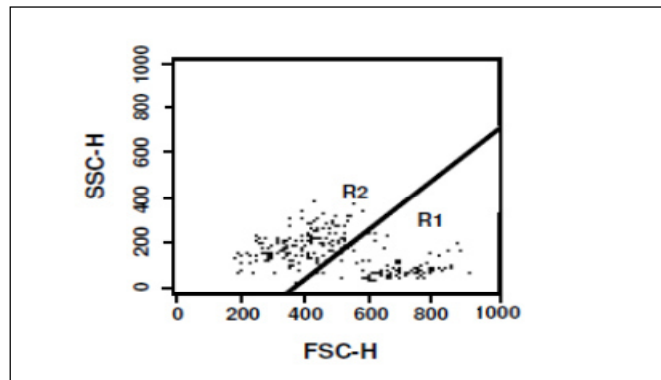


Abb. 3.1: Repräsentative Darstellung der Apoptosemessung mittels FACScan

Quantifizierung der Apoptoserate mittels SSC-H gegen FSC-H. R1 entspricht den lebenden, R2 den toten Zellen.

3.2.2.2. Nicoletti-Färbung der adhären wachsenden Tumorzelllinien

Die Bestimmung der Apoptoserate adhärenter Zelllinien erfolgte mittels Propidiumjodid-Färbung nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991). Hierbei wird die Zellmembran vom Nicoletti-Puffer zerstört und die DNA liegt frei. Somit kann Propidiumjodid an die DNA binden. Zu den Veränderungen während der Apoptose gehört unter anderem die Fragmentation von DNA (Kerr et al., 1972), was zur Folge hat, dass sich in apoptotischen Zellen weniger Propidiumjodid einlagern kann, was in der FACS-Analyse die Unterscheidung zu lebenden Zellen ermöglicht.

Zunächst erfolgte eine Überführung des Überstandes aus den ‚wells‘ der Zellkulturplatte in ein Eppendorf-Gefäß und anschließendes Abzentrifugieren (2000/min, 5 min). Zum Ablösen der adhären Zellen auf der Kulturplatte wurden diese mit jeweils 200 µl Nicoletti-Lysepuffer überschichtet und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgenommen, mit den restlichen Zellen im Eppendorf-Gefäß zusammen gebracht und durch Vortexen vermischt. Direkt vor

der FACScan-Messung erfolgte die Zugabe von 10 µl Propidiumjodid mit einer finalen Konzentration von 50 µg/ml und das erneute Vortexen. In der Durchflusszytometrie (FACScan) erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate im roten Kanal (Fluoreszenz 3) bei abgegrenzter Kernpopulation (Abb. 3.2).

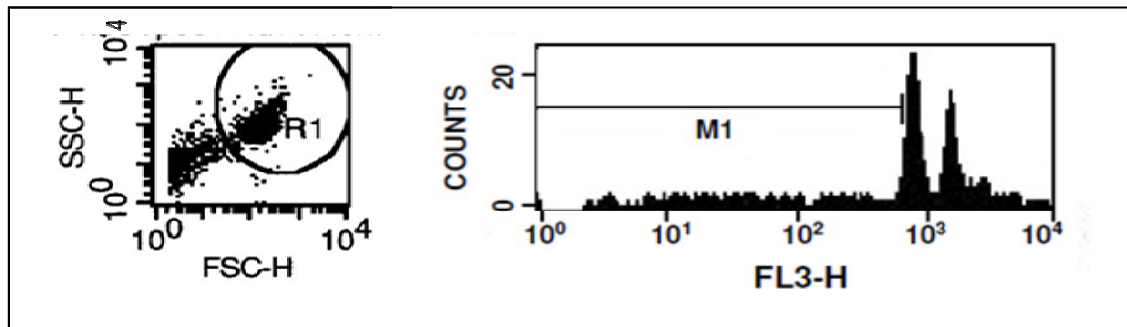


Abb. 3.2: Repräsentative Darstellung der Apoptosemessung mittels Nicoletti-Färbung.

Links: ‚DotBlot‘ als FSC-H gegen SSC-H mit R1-Gate von Zellkernen, gefärbt mit Propidiumjodid.

Rechts: Histogramm mit DNA-Doppelpeak (FL3-H, Rotkanal), welcher G0/G1 bzw. G2 entspricht. M1 trennt die Kerne der toten Zellen von den lebenden Zellen ab.

3.2.2.3. Zellzyklusanalyse

Die Zellen wurden ebenso wie zur Apoptoserate-Ermittlung nach Nicoletti gefärbt (3.2.2.2.). Die Messung am FACScan erfolgte ebenfalls in Fluoreszenz 3, jedoch linear und nicht logarithmisch. Hierbei konnten die Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G0/G1-, S- und M-Phase) unterschieden werden (Abb.3.3).

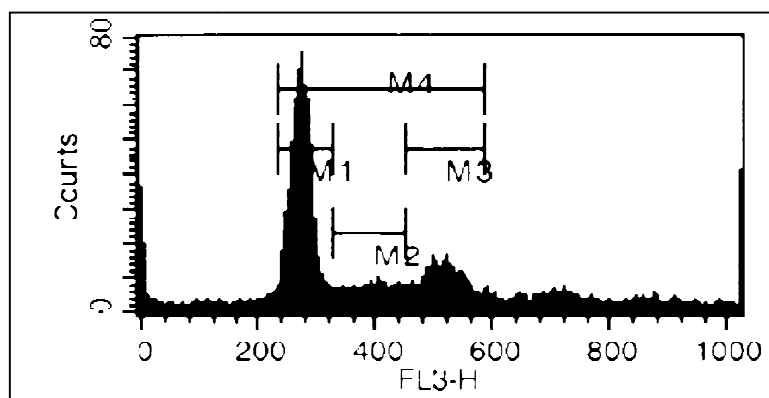


Abb. 3.3: Zellzyklusmessung mittels Nicolettifärbung. Histogramm (FLH-3, Rotkanal) mit Peak der Zellen mit einfachem DNA-Gehalt in der G0/G1-Phase (**M1**), Zellen in der S-Phase (**M2**), Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt in der G2/M-Phase (**M3**) und alle lebenden Zellen (**M4**).

3.2.2.4. Bestimmung des Verlustes des

Mitochondrienmembranpotentials mittels DiOC₆ - Färbung

An der physiologischen Funktion der Mitochondrien als Energielieferanten der Zelle ist der elektrochemische Gradient und damit das Transmembranpotential über der inneren Mitochondrienmembran entscheidend beteiligt. Wird eine Zelle apoptotisch, so nimmt das Membranpotential der Mitochondrien ab (Kroemer et al., 2007). Der grün fluoreszierende und lipophile Farbstoff DiOC₆ (3,3'-dihexyloxacarbocyanine Iodide) ist selektiv für Mitochondrien lebender Zellen und damit gut geeignet um den Verlust des Mitochondrienmembranpotentials zu bestimmen (Korchak et al, 1982). Zur Durchführung der Analyse des Verlustes des Mitochondrien-Membranpotentials wurden die Zellen mit DiOC₆ angefärbt. Nach Ablösen mittels Trypsin wurden die Zellen aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Danach erfolgte das Abzentrifugieren bei 2000 U/min und das Verwerfen des Überstandes. Das Pellet wurde in einer Lösung aus PBS und 1 µl DiOC₆/ml PBS (300µl/well) suspendiert und 15 Minuten bei 37°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung nochmals abzentrifugiert und das „pellet“ in 200 µl PBS aufgenommen. Die Messung am FACScan erfolgte in Fluoreszenz 1, so dass der Peak gerade links von 10³ war.

3.2.3. Proteinstudien

3.2.3.1. Zellyse

Zur Vorbereitung auf die Zellyse wurden Zellen vor und nach Transfektion bzw. vor und nach Stimulation mit Doxorubicin, Vincristin und der Kombination beider Zytostatika nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min). Anschließend wurden sie in 1 ml PBS aufgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut abzentrifugiert (2000 U/min, 5 min). Vor Zugabe des Lysepuffers (Puffer Kern A) zu den Zellpellets wurde diesem ein Proteinaseinhibitor-Cocktail zugesetzt. Die Zellyse erfolgte bei 4°C unter wiederholtem Vortexen nach Zugabe dieser Mischung zu den Zellpellets. Danach erfolgte eine Ultraschallbehandlung mit 5 Impulsen für jeweils 5 Sekunden und das erneute Abzentrifugieren (13000 U/min, 1 min). Der nun entstandene Überstand entsprach dem Lysat des Zytosoles der Zelle, wurde abgenommen, in ein Eppendorf-Gefäße überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.3.3.). Bei Bedarf wurde das Lysat zur Aufbewahrung bei -80°C tiefgefroren.

3.2.3.2. Kernlyse

Zur Auftrennung der Kernfraktion von der zytosolischen Fraktion wurde zunächst die unter 3.2.3.1. beschriebene Zellyse durchgeführt. Nach Abnahme des Zytosol-Überstandes wurde das verbleibende ‚*Kernpellet*‘ mit 40-100 µl Puffer Kern B für 20 Minuten bei 4°C unter wiederholtem Vortexen lysiert. Das Abzentrifugieren erfolgte bei 4°C und 13000 U/min für 5 min. Der dem Kernlysate entsprechende Überstand wurde abgenommen und bei Bedarf zur Aufbewahrung bei - 80°C tiefgefroren.

3.2.3.3. Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt der Versuchsansätze im Einzelnen zu quantifizieren wurde das ‚*BCA mikro kit*‘ von Pierce verwendet, welches Reagenzien mit einem standardisierten Proteingehalt zwischen 0,5 µg/ml und 20 µg/ml enthielt. Die Proteinlösungen wurden dabei jeweils im Vergleich zu einer Standard-Eichkurve untersucht, wobei als Vergleich standardisierte Bicinchoninsäure- (BSA-) Verdünnungen dienten. Alle Ansätze wurden auf 800 µl pipettiert und mit 200 µl der Farblösung vermischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Die Messung erfolgte anschließend im Photometer (ELISA-Reader) bei 562 nm. Durch die Veränderung der Farbreaktion konnte der unterschiedliche Proteingehalt bestimmt werden. Anschließend wurden den Versuchsansätzen so viel PBS zugegeben, dass eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl entstand. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei -80°C tiefgefroren.

3.2.3.4. SDS-Proteinacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren, welches dazu dient, durch Elektrophorese die unterschiedlichen Bestandteile einer Proteinmischung in Abhängigkeit von ihrer Größe aufzutrennen. Bei der Gelelektrophorese wandern größere Proteine im Gel prinzipiell schneller durch das elektrische Feld als kleinere.

Das verwendete SDS-Polyamidgel bestand aus Trenn- und Sammelgel (3.1.6). Nachdem das Trenngel (12%) zwischen 2 Glasplatten des *Biorad PAGE Systems* gegossen wurde, erfolgte eine Übersichtung mit 3 ml Wasser, um einen luftblasenfreien und glatten Übergang zu erzeugen. Nach 30 Minuten zur Polymerisation wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel (4%) aufgegossen. Zum Formen der einzelnen Taschen für die Proteinladung wurde ein spezieller Kamm mit 10 bis 15 Taschen von oben eingesteckt und für ca. 45 Minuten belassen.

Nach dem Auftauen wurde den zu untersuchenden Zelllysaten Lämmli-Puffer im Verhältnis 1:2 zugegeben. Nach Denaturierung auf dem Schüttelinkubator (95°C, 3 min) wurden die Probenansätze auf Eis plaziert. Anschließend wurde zunächst in die erste Tasche des Geles 2µl des sog. Rainbow-Markers als Größen-Standard aufgetragen. So konnte die Größe der aufgetrennten Proteine im Vergleich mit diesem Standard ermittelt werden. In die weiteren Taschen wurden jeweils die Proteinlösungen mit einem Proteingehalt von 12 µg/µl pipettiert. Zunächst wurde mit einer 10-minütigen Einlaufzeit bei 40V begonnen. Nach Einlaufen in das Trenngel wurde die Spannung auf 180V erhöht und zur Auftrennung der Proteine für ca. 60 Minuten konstant belassen. Bei Bedarf wurde der Versuch auch früher gestoppt, wenn die blaue Lauffront das Gel bis unten durchwandert hatte.

3.2.3.5. Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot im sogenannten *Semidry*-Verfahren.

Hierzu wurden zwischen jeweils drei in Transferpuffer getränkten Whatman-Membranen das proteinhaltige Trenngel und eine mit Methanol getränkte PVDF-Membran in die Blotkammer eingebracht und bei 130-200A für 90-120 Minuten die aufgetrennten Proteine übertragen. Zur Markierung der Standardbanden auf der PVDF-Membran wurden die Banden des Rainbow-Markers nach Transfer übertragen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Blotmembran wurde die Membran für 30 Minuten mit TBS-Tween + Milchpulver (5%) auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Zugabe des Primärantikörpers erfolgte für jeweils 10 Minuten das Übersichten und Waschen mit TBS-Tween. Dies wurde insgesamt dreimal wiederholt und anschließend der Primärantikörper, welcher spezifisch an das zu untersuchende Protein bindet, zugegeben. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und deren Verdünnung. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht auf dem Kippschüttler erfolgte abermals das dreimalige Waschen mit TBS-Tween für 10 Minuten. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (Tab.1.2) für mindestens 1 Stunde bei Raumluft. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Primärantikörper. Über die Markierung des Sekundärantikörpers mit *Horse raddish peroxidase* (HRP) erfolgt über eine Chemolumineszenzreaktion die Visualisierung des jeweiligen Proteins.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-Tween und Trocknen wurde die Membran für 2 Minuten mit dem Nachweisreagens (ECL) überschichtet, welches durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase umgesetzt wird. Anschließend erfolgte die Belichtung eines Röntgenfilmes in der Photokammer für 1 Sekunde bis 15 Minuten, welcher anschließend entwickelt wurde.

Um eine Ladungskontrolle durchzuführen erfolgte das sogenannte ‚*Strippen*‘ der Membranen. Hierzu wurden die Membranen bei 50°C mit 30 ml Stripping-Puffer überschichtet und für 30 Minuten inkubiert. Um unspezifische Bindungen auf der Membran zu blockieren erfolgte erneut der Waschvorgang mit TBS-Tween für 10 Minuten und anschließend die Inkubation mit TBS-Tween + Milchpulver (5%) für 30 Minuten. Danach wurden die Membranen erneut dreimalig für 10 Minuten mit TBS-Tween gewaschen. Der Nachweis der Ladungskontrolle erfolgte durch Inkubation der Membran mit α -Tubulin für die Zytosol-Fraktion und mit Histon H1 für die Kernfraktion.

3.2.4. Transfektion

Der Vorgang der Einschleusung rekombinanter DNA in eukaryotische Empfängerzellen wird als Transfektion bezeichnet. Wird das Plasmid dabei nur für eine begrenzte Zeit in das Genom der Zelle integriert, wird dies als transiente Transfektion, der dauerhafte Einbau in das Genom dagegen als stabile Transfektion bezeichnet.

Für die Transfektion wurden die Reagenzien Lipofectamine für SHEP, Lipofectamine 2000 für A 498 verwendet, welche durch Entstehung positiv geladener Liposomen die negativ geladene Plasmid-DNA binden. Die entstehenden Komplexe können dann von der Zielzelle aufgenommen werden.

3.2.4.1. Transiente Transfektion mittels siRNA

Die siRNA (small interfering ribonucleid acid) kann verwendet werden, um Genexpression in der Zelle über RNA-Interaktion auszuschalten. Sie wird an den RISC (RNA-induced silencing complex) gebunden, welcher wiederum an die mRNA bindet, die dieser siRNA komplementär ist. Diese mRNA wird nun gespalten und somit ausgeschaltet.

Für die Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 50000 Zellen/ml in einer 24-well-Platte ausgesät (1ml/well) und im Brutschrank bei 37°C für 24h vorinkubiert.

Anschließend wurde das FCS-haltige Medium abgesaugt und durch ein FCS- und AB-freies Medium ersetzt (400µl/well) und 30 min inkubiert.

In mehreren Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen (Variationen in der Inkubationszeit mit Antibiotika oder von FCS-haltigem Medium) getestet, um eine möglichst geringe Spontanapoptose und hohe Transfektionseffizienz zu erlangen.

Es wurde pro well ein Ansatz aus 25 µl Medium (ohne FCS und Antibiotika) plus 1 µl Lipofectamine und ein Ansatz aus 25 µl Medium (ohne FCS und Antibiotika) plus 100 µM siRNA oder einer Kontroll-Sequenz angefertigt, welche jeweils gevortext und 15 Minuten bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde die Lipofectamine-Mischung zu gleichen Teilen auf die siRNA- und Kontroll-Sequenz-Mischungen verteilt und erneut bei RT 15 Minuten inkubiert. Von den Ansätzen wurden nun je 50 µl/well auf die Zellen verteilt. Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium durch 20% FCS-haltiges Medium (500µl/well) ersetzt.

Nach weiteren 24h wurden für die Westernblot-Analyse die transfizierten Zellen mit Doxo oder PBS als Kontrolle stimuliert und nach 12 und 24 Stunden zu *Pellets* für den Westernblot verarbeitet. Die Stimulation mit Doxo erfolgte, da hierdurch eine Aktivierung von p53 und damit ein Nachweis die *knockdown*-Effizienz auch unter Stimulationsbedingungen möglich war. Der Westernblot wurde dann angefertigt, um den knockdown zu überprüfen.

Für die Apoptose-Messung wurden der andere Teil der Zellen des parallelen Ansatzes 24 Stunden nach Transfektion mit Doxo, VCR und der Kombination stimuliert. Die FACScan-Analyse erfolgte nach 48 Stunden mit der Färbung nach Nicoletti.

3.2.4.2. Stabile Transfektion mittels shRNA Konstrukten

Die shRNA (small hairpin ribonucleid acid) wird in der Zelle zu siRNA gespalten.

Im Gegensatz zur siRNA ist die Transfektion mit shRNA stabil, da diese einen Vektor verwendet, welcher in die Zielzelle eingebracht und an die Tochterzellen weitergegeben wird. Die Plasmide wurden vor Beginn meiner Dissertation in der Arbeitsgruppe hergestellt und standen mir daher zur Verfügung. Es wurde so vorgegangen wie in 3.2.4.1. beschrieben. Zusätzlich zum shRNA-Plasmid wurde ein *scrambled*-Kontroll-Sequenz und PBS zur Kontrolle verwendet. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die Zugabe eines Selektionsagens (Puromycin). Die Anfertigung

der *Pellets* für die Westernblot-Analyse erfolgte 6 Stunden nach Stimulation mit Doxorubicin.

3.2.4.3. Transiente Transfektion des GFP-Survivin Plasmides

Zur Survivin-Überexpression wurde mit einem Plasmid transfiziert, welches Survivin-GFP-Fusionsprotein enthielt (Li et al., 1999). Zur Kontrolle wurde mit einem GFP-Plasmid transfiziert bzw. nur mit PBS behandelt. Es wurde so vorgegangen, wie unter 3.2.4.1. beschrieben. Für SHEP-Zellen wurde Lipofectamine benützt, für A498-Zellen Lipofectamine 2000.

Nachdem die Ansätze auf die Zellen verteilt wurden, wurde bei SHEP-Zellen nach 6 Stunden Inkubationszeit das Medium durch 20% FCS-haltiges Medium (500µl/well) ersetzt. Nach 24h wurde das Medium nochmals gewechselt und durch AB-haltiges Medium ersetzt. Bei A498-Zellen wurde direkt nach 3 h auf AB-haltiges Medium gewechselt.

Die Transfektionseffizienz von Survivin wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie überwacht. Hierzu wurde das im Konstrukt an Survivin gekoppelte GFP verwendet, welches ein grün fluoreszierendes Protein ist, das natürlich in der Quallenart ‚*Aequorea victoria*‘ vorkommt und an verschiedene Proteine gekoppelt werden kann, um deren Expression in der Zelle sichtbar zu machen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die fluoreszierenden Zellen gezählt. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die FACScan-Analyse, um das Verhältnis der GFP-positiven Zellen zur Gesamtzahl der Zellen und damit die Transfektionseffizienz zu berechnen. Dazu erfolgte eine Färbung mit Propidiumiodid wie unter 3.2.2.2. beschrieben. Anschließend erfolgte in der Durchflusszytometrie die Messung von GFP (FLH-1) und PI (FLH3). 24 Stunden nach Transfektion wurden *Pellets* für die Western-Blot-Analyse angefertigt.

3.2.5. Cellscreen - Messung

Für die Cellscreen-Untersuchungen wurden die Zellen wie in 3.2.1.2. beschrieben mit Doxo, VCR und der Kombination stimuliert und nach 0, 24, 48, 72 und 96 h am Cellscreen zur Beurteilung der Zellmorphologie lichtmikroskopische Bilder in 100-facher Vergrößerung gemacht. Hierbei erfolgte eine Computer-gestützte automatische Analyse der lichtmikroskopischen Bilder eines identischen Ausschnittes

um die prozentuale Flächenbedeckung durch Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten darzustellen. Die absolute Apoptoserate wurde zum gleichen Zeitpunkt aus parallelen Ansätzen mittels FACScan gemessen.

3.3. Berechnung und statistische Analyse

3.3.1. ‚fractional product‘ Methode

Als ‚fractional product‘ Methode wird eine von Webb entwickelte Methode bezeichnet, welche dazu dient den Effekt durch Kombination von zwei oder mehr Therapeutika zu bestimmen (Webb, 1963). Um den Effekt einer kombinierten Verabreichung von Doxorubicin und Vincristin abzuschätzen wurde folgende Berechnung verwendet:

$$\text{kalkulierte spezifische Apoptoserate} = D + V - D \times V$$

D: spezifische Apoptoserate induziert durch Doxo

V: spezifische Apoptoserate induziert durch VCR

Als relevanter Antagonismus wurde ein fractional product (FP) $< -0,1$ definiert, ein FP von $>0,1$ als relevanter Synergismus. Liegt der Wert zwischen $-0,1$ und $0,1$ handelt es sich um einen additiven Effekt. Abbildung 4 zeigt eine exemplarische graphische Darstellung.

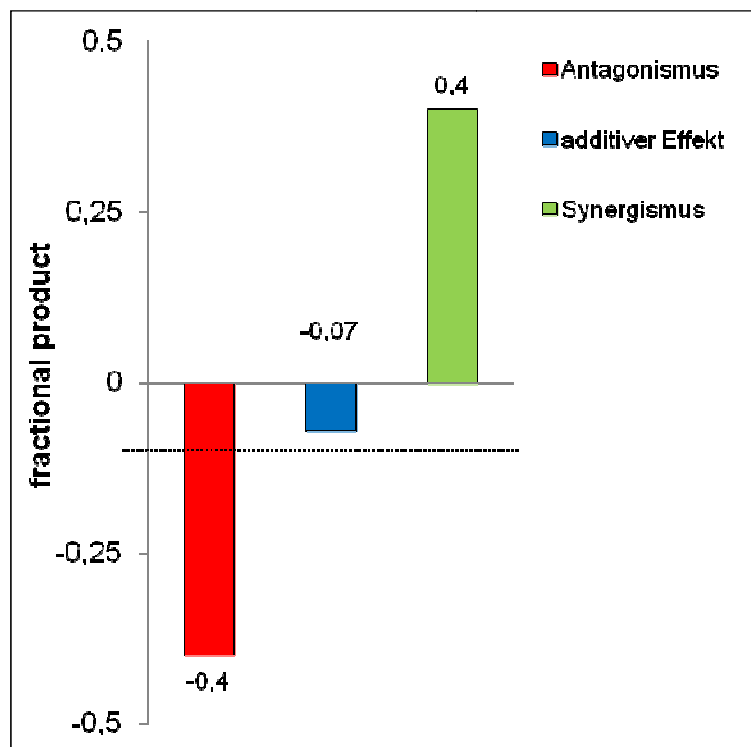


Abb.4: Exemplarische graphische Darstellung des ‚fractional product‘ (FP). Der rote Balken stellt einen relevanten Antagonismus dar (FP $< -0,1$), der grüne Balken einen relevanten Synergismus (FP $>0,1$), der blaue Balken einen additiven Effekt (FP $<0,1$ und $>-0,1$).

3.3.2. Spezifische Apoptose

Für die Auswertung der FACScan-Ergebnisse wurde die spezifische Apoptoserate durch ein bestimmtes Stimulanz berechnet, wozu folgende Formel verwendet wurde:

$$\text{Spezifische Apoptose (\%)} = \text{ZA} - \text{SA} / 100 - \text{SA}$$

ZA = Zytostatikum-induzierte Apoptose

SA = spontane Apoptose

Um ideale Voraussetzungen zur Erkennung einer synergistischen Interaktion zu erreichen wurden für die Auswertbarkeit der einzelnen Experimente folgende Kriterien festgelegt:

1. Spontane Apoptose: < 10%
2. Bei CADO Zellen wegen der stets hohen spontanen Apoptoserate in Zellkultur <30%

3.3.3. Statistische Analyse

Für die FACScan-Messungen wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Die Darstellung erfolgte als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler, 'standard error of the mean'). Zur statistischen Analyse wurde mit der Software SigmaStat ein gepaarter t-test bzw. für multivariante Datenanalyse ein ONE WAY RM ANOVA durchgeführt. Dabei konnten statistisch signifikante Unterschiede zweier Behandlungen festgestellt werden, welche dann bei einem p-Wert <0,05 als statistisch signifikant bewertet und mit * gekennzeichnet wurden.

4. Ergebnisse

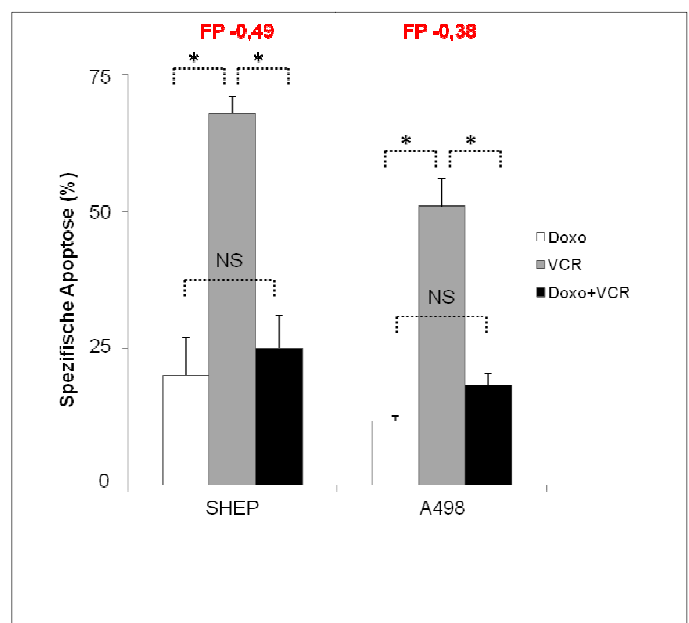
In der pädiatrischen Onkologie werden Doxorubicin (Doxo) und Vincristin (VCR) im Rahmen von Polychemotherapieprotokollen zusammen verabreicht (Kapitel 2.3). Aufbauend auf den Ergebnissen meiner Arbeitsgruppe, welche auf Leukämiezelllinien zeigen konnte, dass Doxorubicin die VCR-induzierte Apoptose-Kapazität einschränkt, sollte nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Häufigkeit der Interaktion und der zugrundeliegende Mechanismus dieses Phänomens untersucht werden.

4.1. Antagonistischer Effekt im Bezug auf die induzierte Apoptose durch die kombinierte Applikation von Doxorubicin und Vincristin

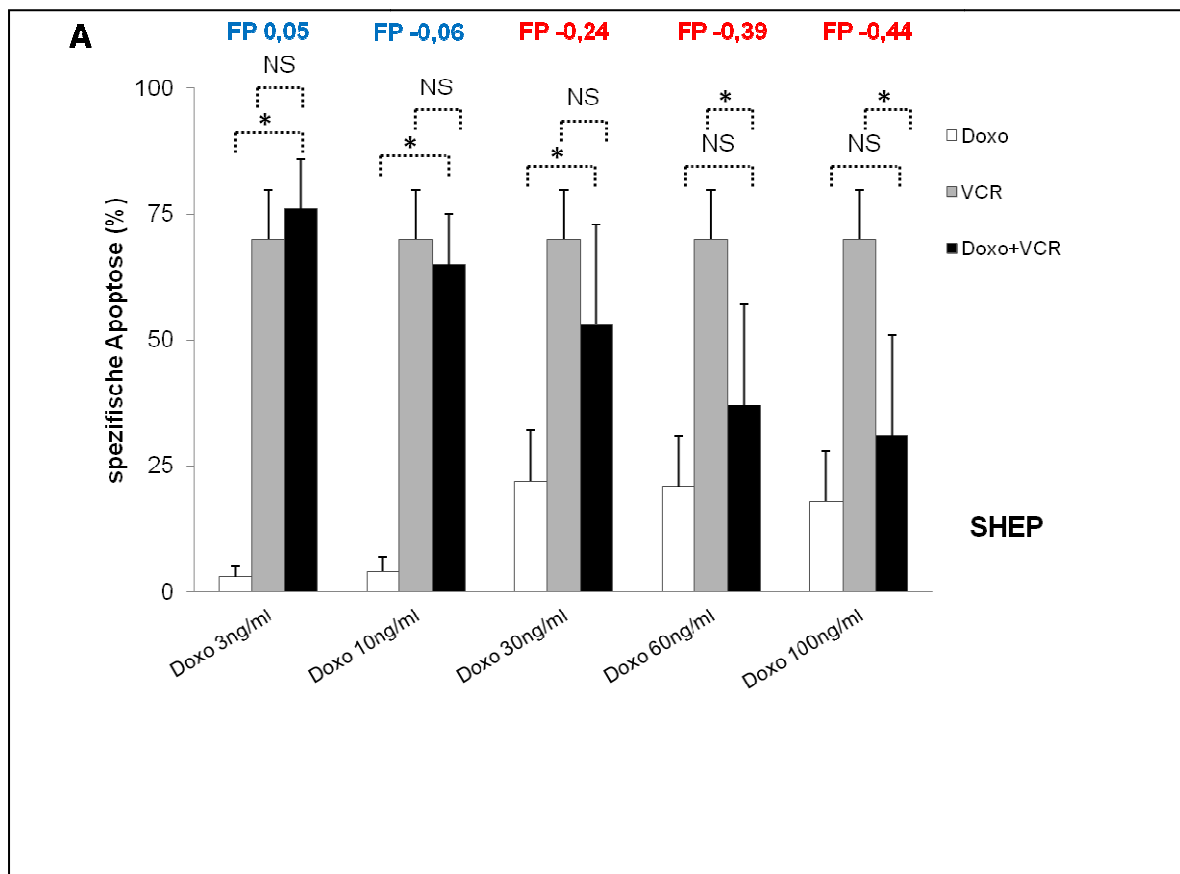
Neuroblastome werden in den heute verwendeten Chemotherapieprotokollen mit der Kombination aus Doxorubicin und Vincristin behandelt. Wegen dieser hohen klinischen Relevanz wurde die Neuroblastomzelllinie SHEP zunächst für die Untersuchungen verwendet. Zusätzlich wurden die wichtigen Experimente als ‚*proof of principle*‘ zusätzlich auf der Nierenkarzinom-Zelllinie A498 durchgeführt, um die Ergebnisse auf einer weiteren Zelllinie einer anderen Tumorentität und Gewebeart zu bestätigen.

Abb.5: Antagonistischer Effekt der Kombinationstherapie von Doxorubicin und Vincristin bei simultaner Applikation.

FACScan-Apoptoseanalyse zur Untersuchung der spezifischen Apoptose durch Stimulation mit Doxo, VCR und der Kombination mittels Nicoletti-Färbung. SHEP- und A498-Zellen wurden mit Vincristin (300 ng/ml), Doxorubicin (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert. Die FACScan-Analyse erfolgte nach weiteren 96h. In roter Schrift sind die Werte des Fractional Product (FP) angegeben. Darstellung der Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM. * $p < 0,05$, NS=nicht signifikant.



#Zunächst sollte die jeweilige Apoptoseinduktion durch die Einzelsubstanzen und die Kombination quantifiziert werden. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde wie in 3.2.2.1. beschrieben mittels Nicoletti-Färbung in der FACScan-Analyse quantifiziert. Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, induzierte Doxo im Gegensatz zu VCR alleine in dem gewählten experimentellen Setting nur eine geringe Apoptoserate. Bei simultaner Applikation von VCR und Doxo kam es jedoch zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Verminderung der Apoptose im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit VCR. Die Berechnung mittels der ‚fractional product‘ - Methode bestätigte die antagonistisch Wirkung zwischen den beiden Substanzen mit FP-Werten $< -0,1$.



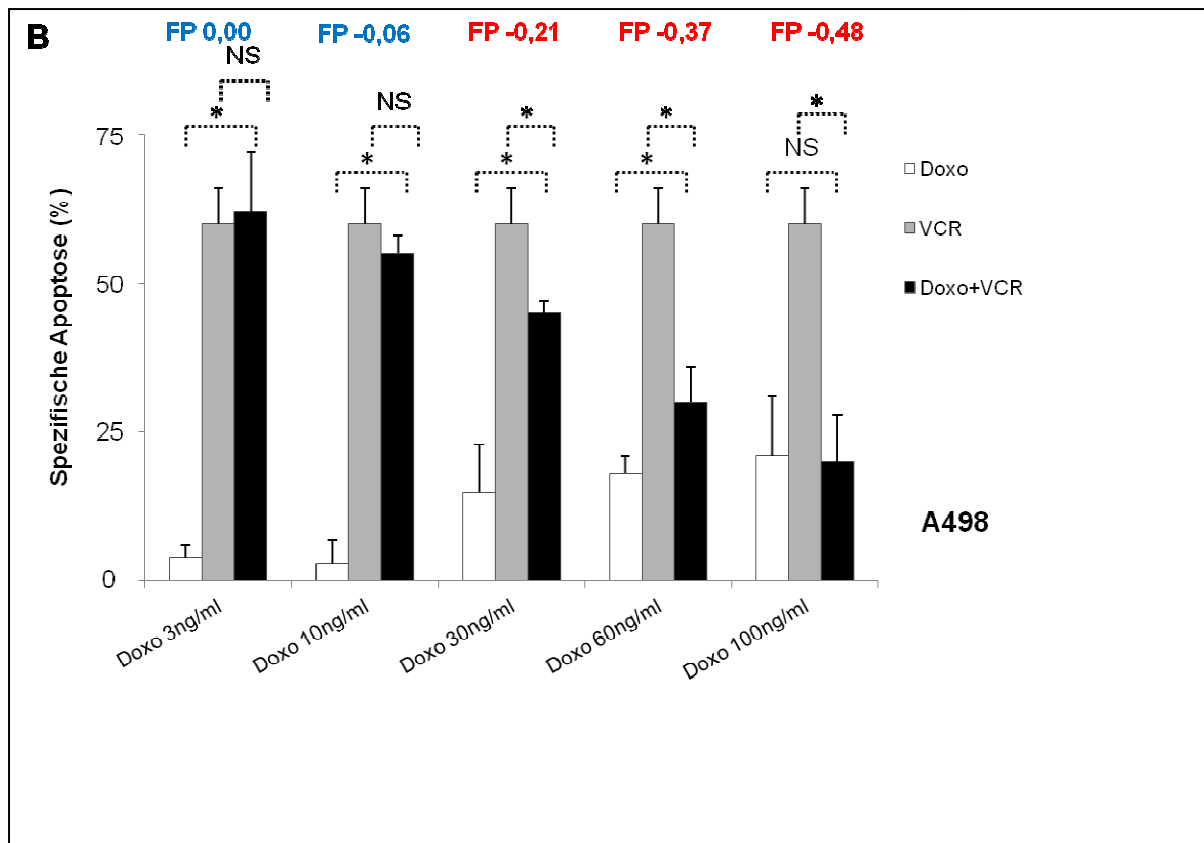


Abb. 6: Dosis-Abhängigkeit der antagonistischen Wirkung von Doxorubicin bis zum therapeutischen Spitzenspiegel. FACScan-Apoptoseanalyse mittels Nicoletti-Färbung zur Untersuchung des Antagonismus bei unterschiedlichen Doxo-Konzentrationen. SHEP-Zellen (A) und A498-Zellen (B) wurden mit Vincristin (300 ng/ml), Doxorubicin in den angezeigten Konzentrationen oder der Kombination stimuliert. Die Applikation erfolgte simultan, die FACScan-Analyse erfolgte nach 96h. In roter Schrift sind die Werte des Fractional Product (FP) $< -0,1$ angegeben, welche einen antagonistischen Effekt widerspiegeln; in blauer Schrift die Werte zwischen $-0,1$ und $0,1$, welche einen additiven Effekt widerspiegeln. Darstellung der Mittelwerte aus $n=3$ unabhängigen Experimenten \pm SEM. * $p < 0,05$, NS=nicht signifikant.

Untersuchte man unterschiedliche Doxo-Konzentrationen, so war der antagonistische Effekt umso ausgeprägter, je höher die verwendete Doxorubicindosis bis zum Erreichen des therapeutischen Spitzenspiegels war (Abb. 6). Ab einer Konzentration von 30 ng/ml für A498-Zellen und 60 ng/ml für SHEP-Zellen war der Unterschied zwischen VCR-induzierter Apoptose und der Kombination aus Doxo und VCR statistisch signifikant. Mittels ‚fractional product‘-Analyse wurde für eine Konzentration zwischen 30 ng/ml und 100 ng/ml eine antagonistischer Wechselwirkung zwischen Doxo und VCR, für eine Konzentration von 3 ng/ml und 10 ng/ml ein additiver Effekt nachgewiesen.

Wie Abbildung 7 zeigt, persistierte der Antagonismus über einen Zeitraum von bis zu 144 h. Dies entspricht der Limitierung der Zellkulturbedingungen in dem gewählten Setting. Der Unterschied zwischen VCR-induzierter Apoptose im Vergleich zur Kombination von Doxo und VCR war statistisch signifikant.

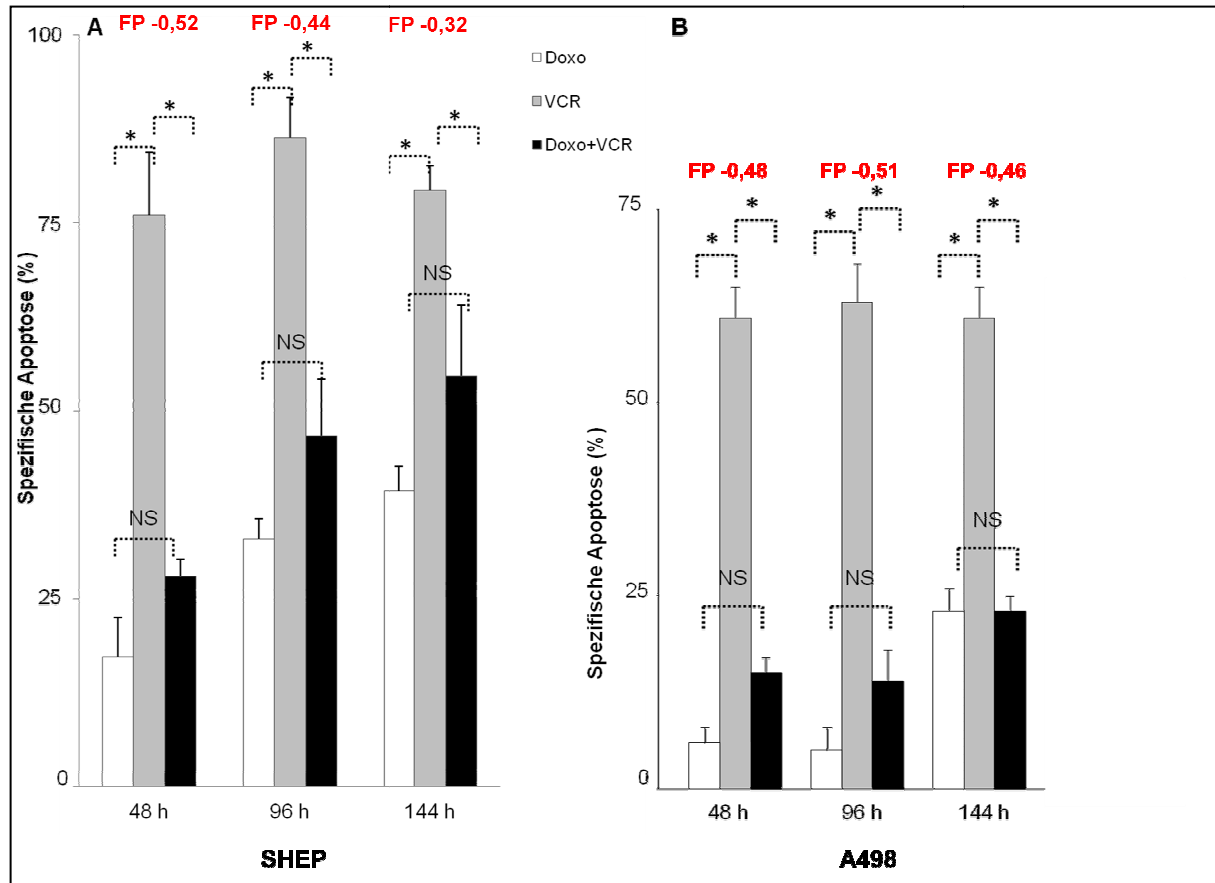


Abb. 7: Persistenz des Antagonismus über ein Zeitintervall von 144 h. FACScan-Apoptoseanalyse mittels Nicoletti-Färbung zur Untersuchung des Antagonismus über einen Zeitraum von 144 h. **(A)** SHEP-Zellen wurde mit Vincristin (300 ng/ml), Doxorubicin (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert. Die Applikation erfolgt simultan, die FACScan-Analyse erfolgte nach 48h, 96h und 144h wie dargestellt. **(B)** A498-Zellen wurden analog behandelt. In roter Schrift sind die Werte des Fractional Product (FP) <-0,1 angegeben, welche einen antagonistischen Effekt widerspiegeln. Darstellung der Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM. * $p < 0,05$, NS=nicht signifikant.

4.1.1. Vermehrtes Koloniewachstum unter der Kombinationstherapie von Doxo und VCR im Vergleich zu den Einzelsubstanzen

Neben den Effekten auf die Apoptoseinduktion wurde in einem nächsten Schritt untersucht, wie sich die unterschiedlichen Einzeltherapien und die

Kombinationstherapie auf das Zellwachstum und die Wellbedeckung auswirken. Dies diente dazu, den Antagonismus mit einer zweiten, unabhängigen Messtechnik zu bestätigen. Per digitaler Photographie wurde das Wachstum der SHEP- und A498-Zellen über eine 96-stündige Inkubation mit VCR, Doxo und der Kombination untersucht. Abbildung 8 zeigt Bilder dieser Cellscreen-Untersuchung, welche zeigen, dass es in der unbehandelten Kontrolle, nach Einzeltherapie mit Doxo oder der Kombinationstherapie zu einem größeren Koloniewachstum kam, als nach alleiniger Stimulation mit VCR.

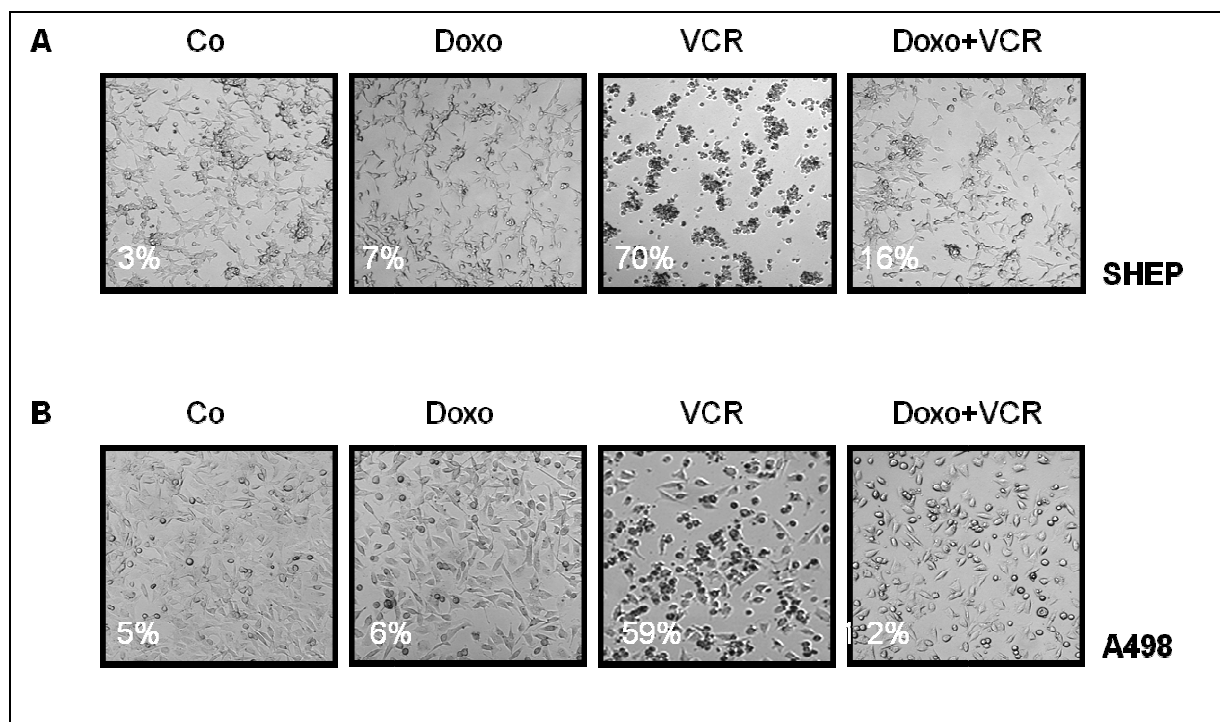
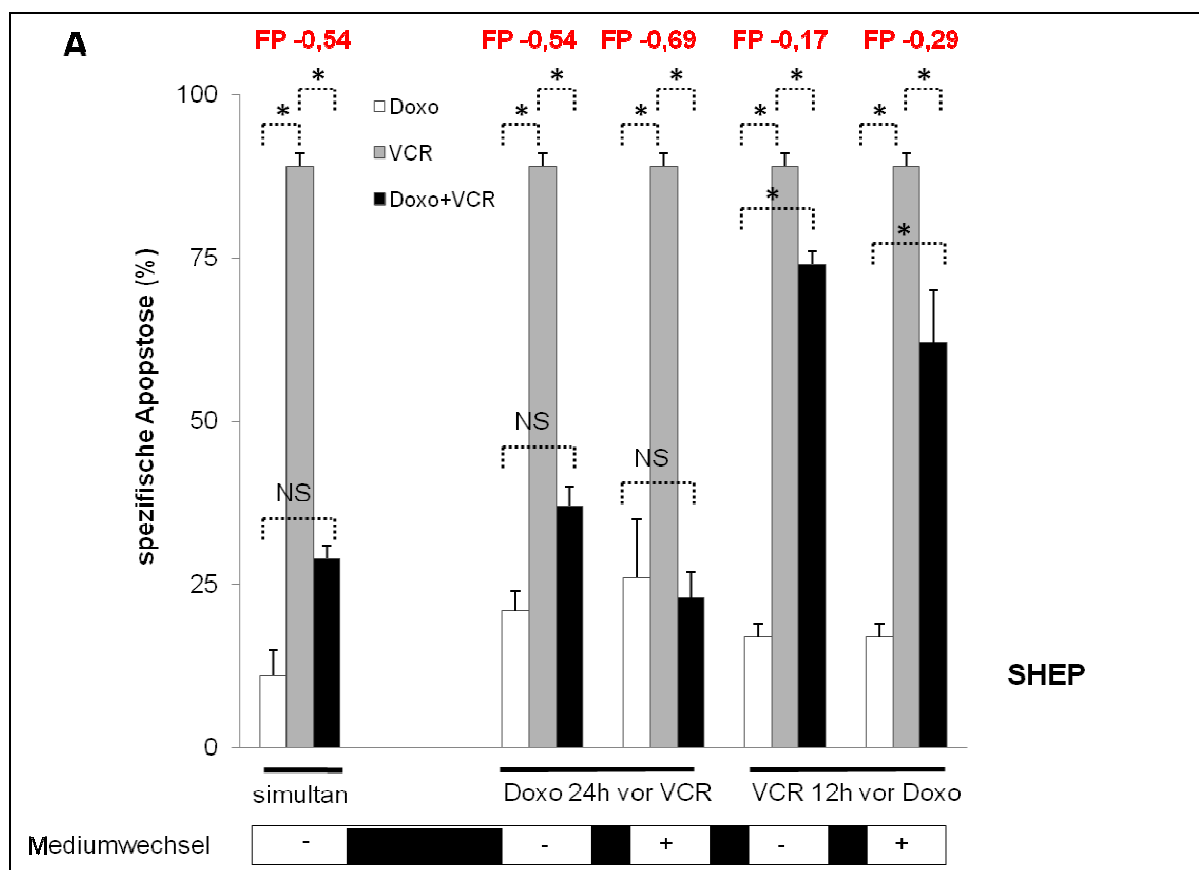


Abb. 8: Vermehrtes Koloniewachstum nach Kombination von Doxo und VCR im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit VCR. SHEP-Zellen (A) und A498-Zellen (B) wurden mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert. Co= unbehandelte Kontrolle. Das Wachstum der Zellen wurde per digitaler Photographie nach 96 h dokumentiert. Die Prozentangaben stellen die absolute Apoptoserate einer nachfolgend durchgeführten FACScan-Analyse dar. Zur besseren Darstellung wurden alle Bilder in gleicher Weise mit Microsoft Office Picture Manager nachbearbeitet (Helligkeit +10%, Kontrast +20%)

4.1.2. Ausschluss einer direkten Substanzinteraktion zwischen Doxo und VCR

In einem nächsten Schritt wurde ausgeschlossen, dass eine direkte Substanzinteraktion im Kulturmedium vor Aktivierung der intrazellulären Signalwege

für den Antagonismus verantwortlich ist. Hierzu wurde die Apoptoserate des experimentellen Settings mit und ohne Mediumwechsel vor der Stimulation mit dem zweiten Zytostatikum verglichen. Dabei wurde sowohl untersucht, welche Auswirkung die vorhergehende Gabe von Doxo als auch von VCR vor Mediumwechsel auf die Apoptoseinduktion hat. Wie in 3.2.1.2. beschrieben, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor Zugabe des jeweils anderen Chemotherapeutikums das Kulturmedium verworfen und durch frisches ersetzt. Die Apoptosehemmung durch Doxo zeigte sich bei Gabe von Doxo vor oder simultan mit VCR unabhängig vom Mediumwechsel, was darauf hinwies, dass keine direkte Interaktion der beiden Stimulanzen im Kulturmedium vorlag (Abb. 9).



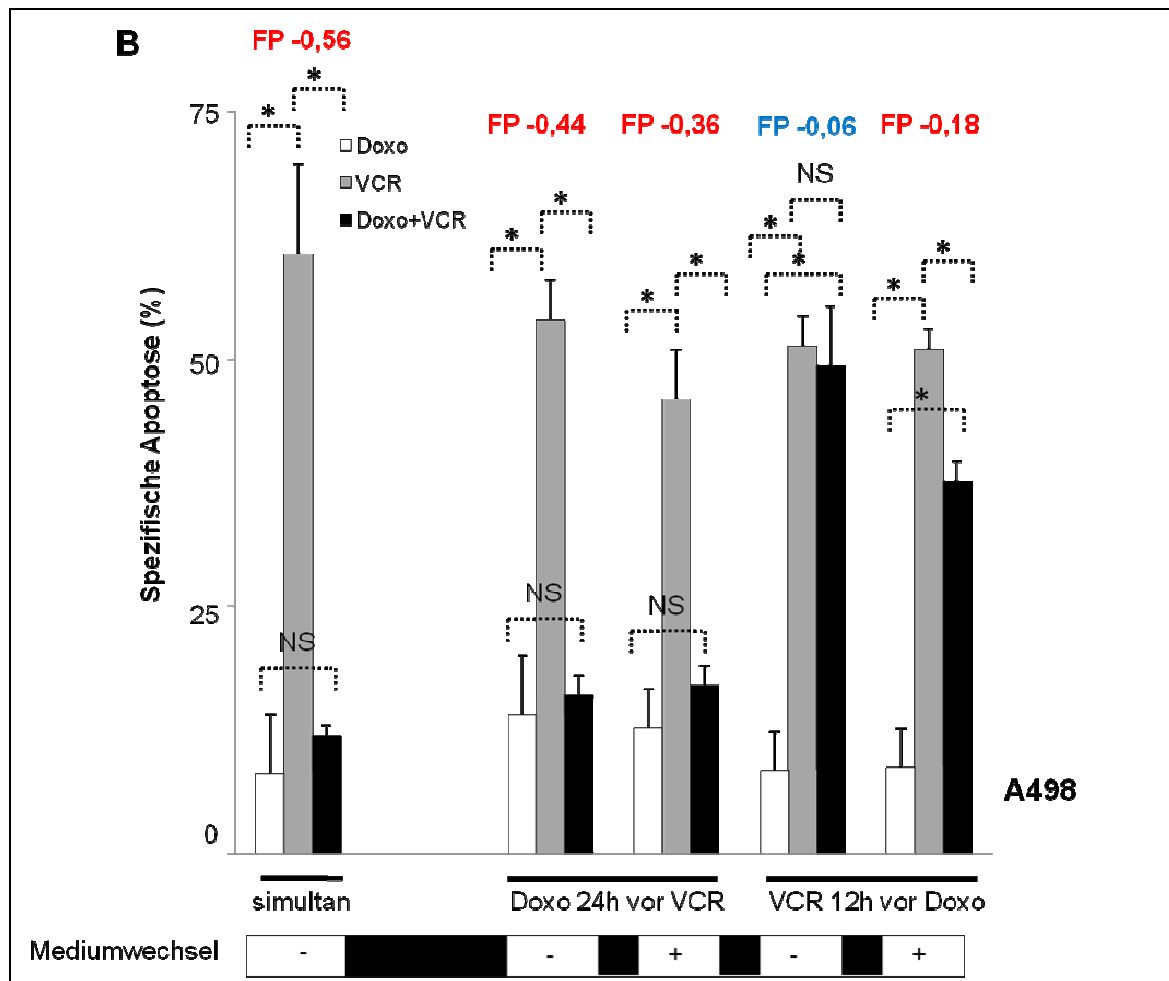


Abb.9: Verminderter Antagonismus durch zeitversetzte Applikation von Doxo vor VCR und Ausschluss einer direkten Substanzinteraktion im Kulturmedium. FACScan-Apoptoseanalyse mittels Nicoletti-Färbung zur Untersuchung des antagonistischen Effektes durch zeitversetzte Applikation und Mediumwechsel. SHEP-Zellen (A) und A498-Zellen (B) wurden mit Vincristin (300 ng/ml), Doxorubicin (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert. Die Applikation erfolgte entweder simultan oder zeitversetzt wie in der Legende der Abbildung beschrieben. Der Mediumwechsel (+) erfolgte direkt vor Zugabe der jeweils anderen Substanz. Die FACScan-Analyse erfolgte nach weiteren 48h. In roter Schrift sind die Werte des Fractional Product (FP) $< -0,1$ angegeben, welche einen antagonistischen Effekt widerspiegeln; in blauer Schrift die Werte zwischen $-0,1$ und $0,1$, welche einen additiven Effekt widerspiegeln. Darstellung der Mittelwerte aus $n=3$ unabhängigen Experimenten \pm SEM. * $p < 0,05$, NS=nicht signifikant.

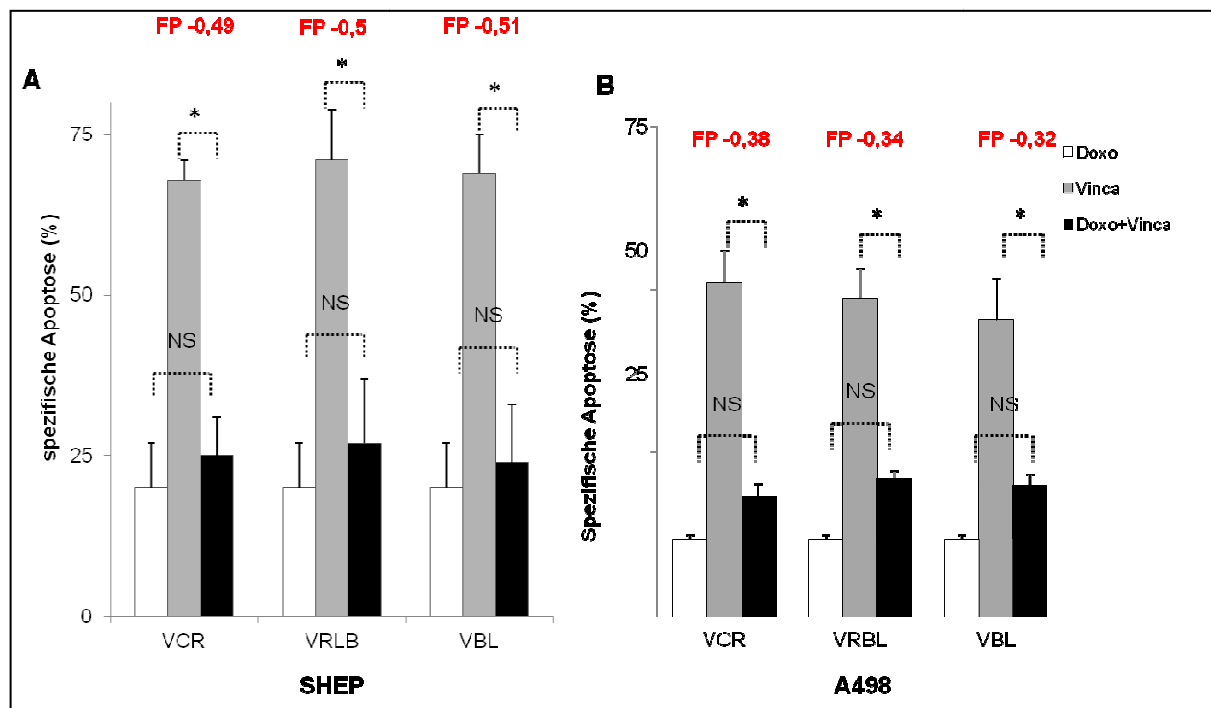
4.1.3. Verminderung des Antagonismus durch zeitversetzte Applikation

Durch zeitversetzte Applikation konnte dieser Antagonismus fast komplett verhindert werden, wenn die Zellen für 12 h mit VCR vorinkubiert wurden. Dies wurde auch durch die Werte des ‚fractional product‘ (FP) bestätigt, welche für die Vorinkubation mit VCR ohne Mediumwechsel einen additiven Effekt (FP -0,06) und für die Vorinkubation mit VCR mit Mediumwechsel einen deutlich reduzierten

antagonistischen Effekt mit einem FP von -0,18 zeigten. Der Antagonismus war unverändert nachweisbar, wenn Doxo zuerst appliziert und Doxo vor Zugabe von VCR aus dem Zellkulturmedium ausgewaschen wurde. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass durch die Vorinkubation mit VCR bereits eine intrazelluläre Apoptosesignaltransduktion initiiert wurde, welche es Doxo bei verzögerter Zugabe nicht mehr erlaubte, die Apoptose zu inhibieren (Abb.9).

4.1.4. Generelle antagonistische Wechselwirkung zwischen Anthrazyklinen und Vinca-Alkaloiden

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es eine generelle antagonistische Wechselwirkung zwischen den beiden Substanzklassen gibt. Hierzu wurde die Kombination von VCR mit anderen Anthrazyklinen (Daunorubicin und Epirubicin) und Doxo mit anderen Vinca-Alkaloiden (Vinorelbin und Vinblastin) untersucht. Daunorubicin und Epirubicin hemmten ebenfalls die VCR-induzierte Apoptose statistisch signifikant (Abb. 10 A und B) und Doxo hatte auch bei Kostimulation mit Vinorelbin und Vinblastin einen statistisch signifikanten antiapoptotischen Effekt (Abb. 10 C und D). Dies zeigt also, dass der Antagonismus nicht nur auf die Einzelsubstanzen Doxo und VCR der beiden Substanzklassen beschränkt ist, sondern dass es sich um ein generelles Phänomen bei Kombination dieser beiden Substanzklassen handelt.



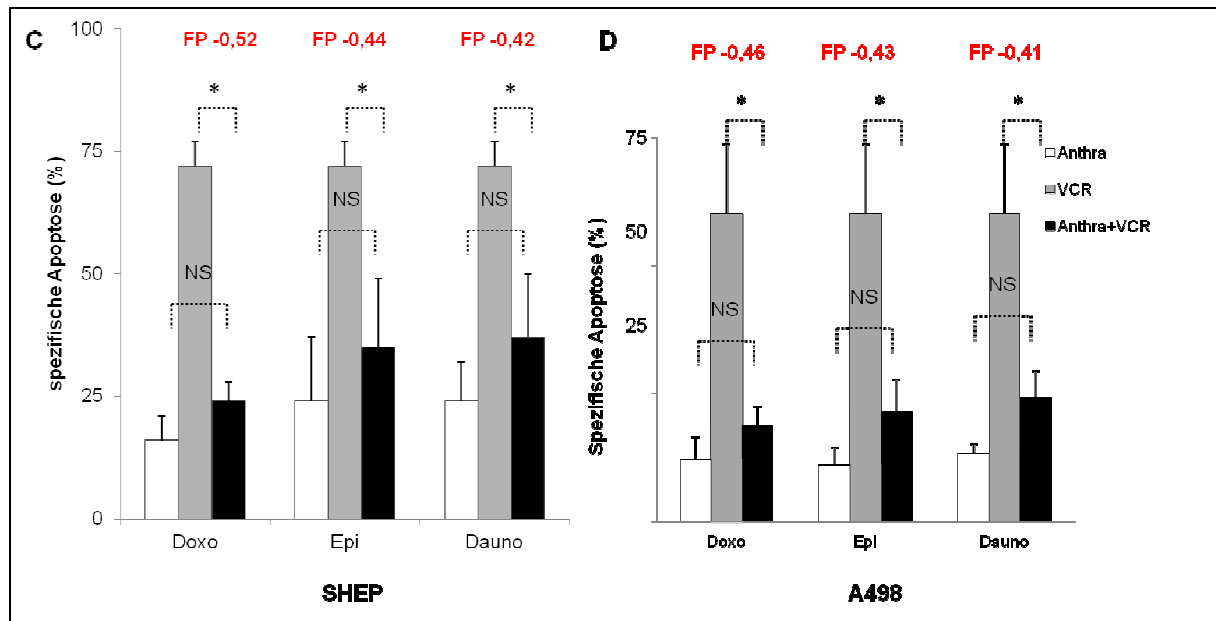


Abb. 10: Antagonistische Wirkung von Doxo auf die Apoptoseinduktion durch weitere Vinca-Alkaloide und antagonistische Wirkung weiterer Anthrazykline auf die VCR-induzierte Apoptose. FACScan-Apoptoseanalyse mittels Nicoletti-Färbung zur Untersuchung des Antagonismus bei Kombination von Doxo mit andere Vinca-Alkaloiden und VCR mit anderen Anthrazyklinen.

(A-B) Zellen wurden mit Doxo (100 ng/ml), den Vinca-Alkaloiden (=Vinca) Vincristin (VCR), Vinorelbin (VRBL), Vinblastin (VBL) jeweils mit 300 ng/ml oder der Kombination aus Doxo und dem Vinca-Alkaloid stimuliert. Die Applikation erfolgte simultan, die FACScan-Analyse mittels Nicoletti-Färbung erfolgte nach 96h. Die Ergebnisse für die SHEP Zellen sind in der Abbildung 8A, die für die A498-Zellen in der Abbildung 8B dargestellt.

(C-D) Zellen wurden mit VCR (300 ng/ml), den Anthrazyklinen (=Anthra) Doxorubicin (Doxo), Epirubicin (EPI) oder Daunorubicin (Dauno) jeweils mit (100 ng/ml) oder der Kombination aus VCR und dem Anthrazyklin stimuliert. Die Applikation erfolgte simultan, die FACScan-Analyse erfolgte nach 96h. Die Ergebnisse für die SHEP Zellen sind in der Abbildung 8C, die für die A498-Zellen in der Abbildung 8D dargestellt.

In roter Schrift sind die Werte des Fractional Product (FP) $< -0,1$ angegeben, welche einen antagonistischen Effekt widerspiegeln. Darstellung der Mittelwerte aus $n=3$ unabhängigen Experimenten \pm SEM. $*p < 0,05$, NS=nicht signifikant.

4.1.5. Bestimmung der Häufigkeit der Interaktion von VCR und Doxo auf epithelialen, neuroektodermalen, hämatopoetischen und mesenchymalen Tumorzelllinien

Um die Häufigkeit dieser antagonistischen Apoptoseinduktion und damit die generelle Relevanz auf einer Vielzahl von Tumorzelllinien zu quantifizieren, wurden

n=23 weitere Zelllinien unterschiedlicher Entitäten und Gewebespezifitäten untersucht. Es wurden sowohl Zelllinien untersucht, die nach aktuellen Chemotherapieprotokollen mit der Kombination aus Vinca-Alkaloiden und Anthrazyklinen behandelt werden (Neuroblastom, Leukämie, Lymphom, Ewing-Sarkom) als auch Zelllinien von Tumoren, die aktuell nicht mit dieser Kombinationstherapie behandelt werden (Brustkrebs, Cervix-CA, Colon-CA, Lungenkrebs, Prostata-CA, Rhabdomyosarkom), aber bei denen teilweise schon diese Kombination in Rahmen von Studien untersucht wurde. Abbildung 10 zeigt die Medikamenteninteraktion zwischen Doxo und VCR dargestellt über das ‚fractional product‘ (FP). Wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben stellt ein FP von $<-0,1$ einen antagonistischen Effekt zweier Substanzen dar, wohingegen ein FP $>0,1$ einen synergistischen Effekt bedeutet. Liegt der Wert dazwischen handelt es sich um einen additiven Effekt. Abbildung 11-A zeigt eine Übersicht über die untersuchten soliden Tumoren. Hier konnte der Antagonismus bei allen 10/10 Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei zeigten n=6 Zelllinien ein FP zwischen -0,20 und -0,35, n=4 ein FP zwischen -0,35 und -0,55. Unter den untersuchten n=9 Leukämie- und Lymphomzelllinien zeigten die B-ALL-Zelllinien BOE und BJAB sowie die T-ALL-Zelllinie HUT78 keinen Antagonismus, und auch keinen Synergismus (Abb. 11-B). Die zwei Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L428 und KMH2, die B-ALL-Zelllinien SKW-6 und NALM-6, die CML-Zelllinie THP-1, sowie die AML-Zelllinie HL-60 zeigten einen antagonistischen Effekt von Doxo auf die VCR-induzierte Apoptose (Abb. 11-B). Bei den beiden Hodgkin-Lymphom-Zelllinien zeigte sich ein FP zwischen -0,29 und -0,32, bei den Leukämiezelllinien mit Antagonismus ein FP zwischen -0,14 und -0,29. Bei den n=4 mesenchymalen Zelllinien zeigten zwei Ewing-Sarkom-Zelllinien (CADO, RD) ebenso wie die Rhabdomyosarkom-Zelllinien (RH30, RMS30) einen antagonistischen Nettoeffekt bei Kostimulation von Doxo mit VCR (Abb. 11-C). Darunter konnte bei n=3 der mesenchymalen Zelllinien ein negatives FP zwischen -0,33 und -0,39 nachgewiesen werden, eine Zelllinie zeigte eine FP von -0,16. Ein synergistischer Wirkeffekt wurde bei den verwendeten Dosierungen bei keiner der Zelllinien dokumentiert.

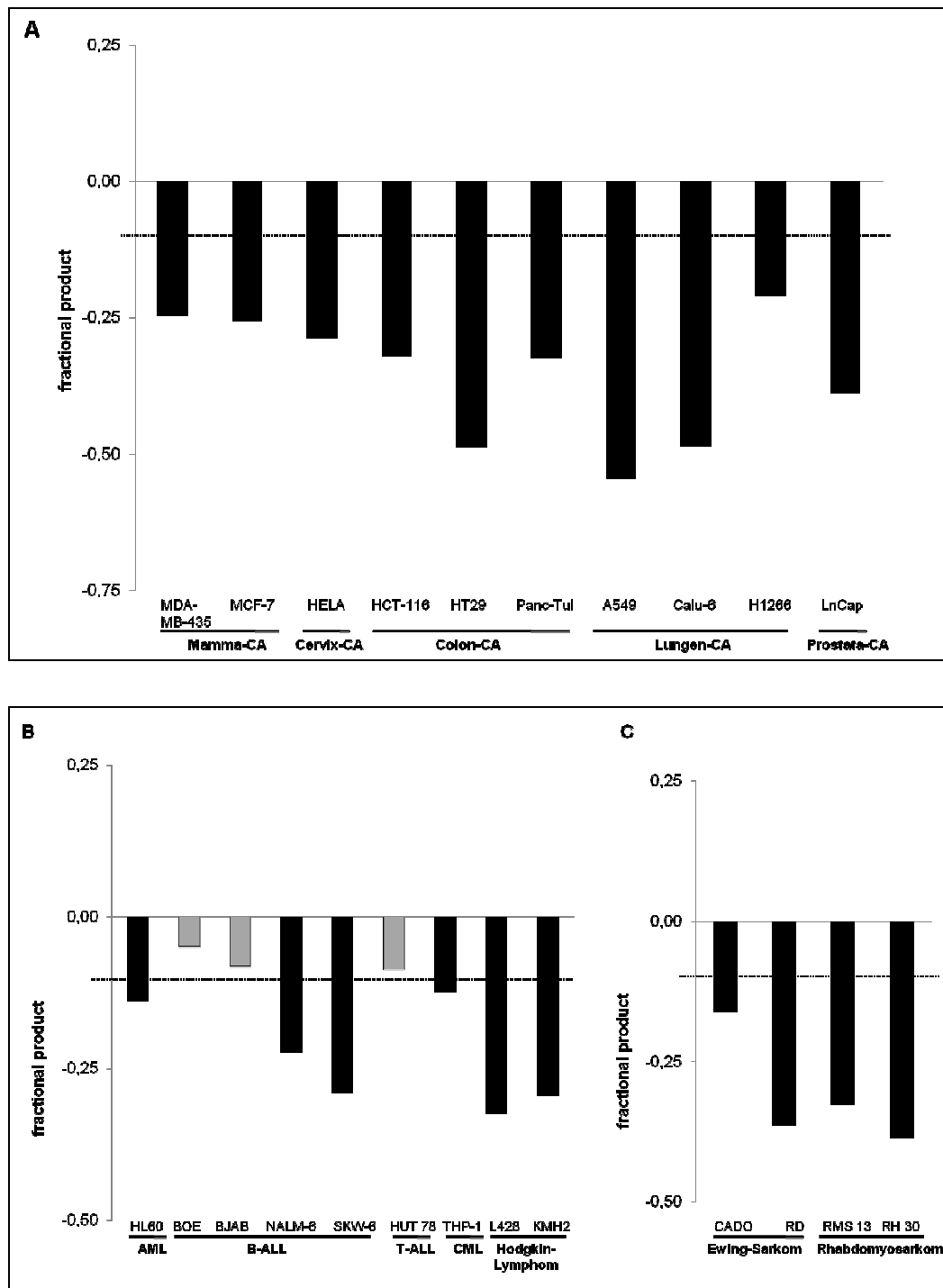


Abb. 11: Häufigkeit der antagonistischen Interaktion von VCR und Doxo auf epithelialen, neuroektodermalen (A), hämatopoetischen (B) und mesenchymalen (C) Tumorzelllinien.

„Fractional Product“ zur Darstellung des Antagonismus von n=23 Zelllinien. Zellen wurden mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert außer Hela: VCR (30 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) und Cado: VCR (300 ng/ml), Doxo (300 ng/ml). Die FACScan-Apoptoseanalyse mittels Nicoletti-Färbung erfolgte nach 96h. Dargestellt mit schwarzen Balken ist das wie unter 3.3.1. beschrieben berechnete „fractional product“ (FP), wobei Werte von $<-0,1$, als Antagonismus definiert wurden. Die grauen Balken zeigen einen FP $>-0,1$ aber $<0,1$, also einen additiven Effekt.

Zusammenfassend konnte insgesamt bei 22/25 Zelllinien (inklusive der bereits ausführlich dargestellten Ergebnisse auf den SHEP und A498 Zelllinien) ein antagonistischer Effekt nachgewiesen werden, bei 3/25 kam es zu keiner signifikanten Änderung der VCR-induzierten Apoptose durch Doxo. Bei keiner der untersuchten Zelllinien wurde ein synergistischer Effekt nachgewiesen.

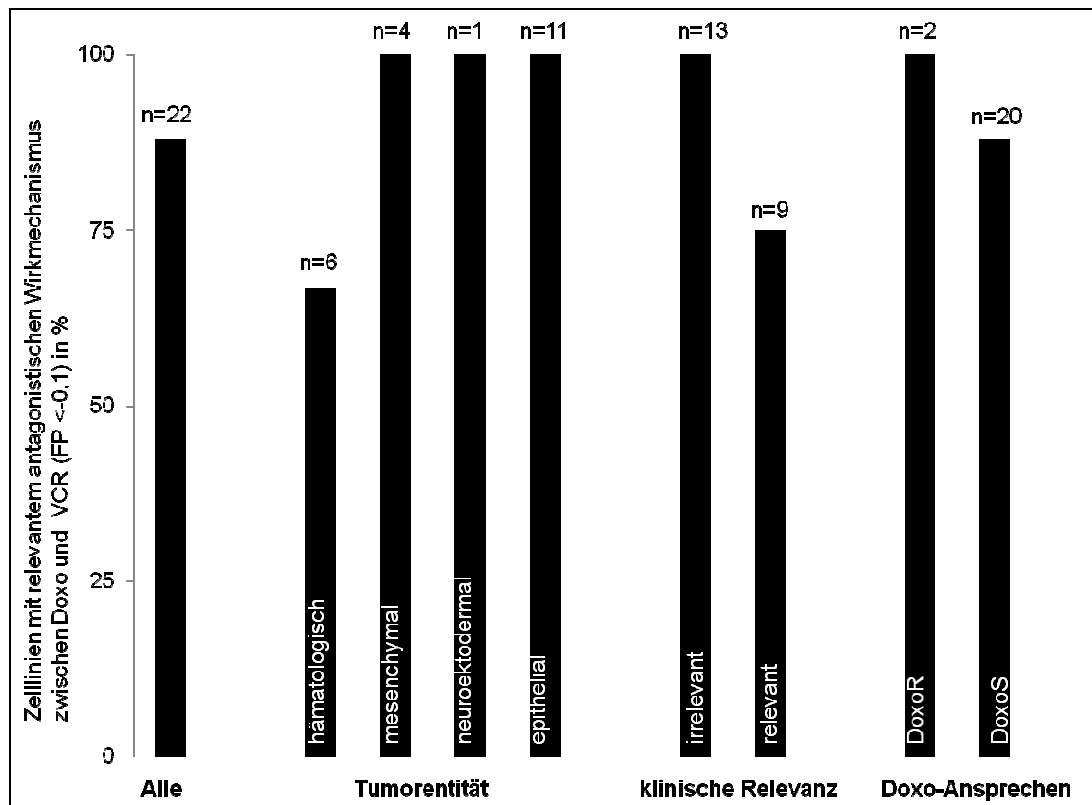


Abb. 12: Separate Darstellung der Untersuchungsergebnisse aus der Abbildung 9 für die Parameter Tumorentität, Anwendung der Kombinationstherapie in aktuellen Therapieprotokollen (klinische Relevanz) und Apoptosesensitivität der Zelllinien gegenüber Doxorubicin (Doxo-Ansprechen). n = Anzahl untersuchter Zelllinien. Zellen wurden subklassifiziert nach Tumorentität, klinischer Relevanz und Apoptoseinduktion durch Doxo. Als klinisch relevant wurden solche Zelllinien bezeichnet, welche im klinischen Alltag mit der Kombination aus Doxo und VCR behandelt werden. Doxo-Resistenz wurde definiert als spezifische Apoptose <10%. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zelllinien mit relevantem antagonistischen Wirkmechanismus zwischen Doxo und VCR ($FP < 0,1$). Detaillierte Apoptose-Analyse siehe Abb.11

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Abbildungen nach folgenden Analyse Kriterien zusammengefasst: 1.) Tumorentität, 2.) Anwendung der Kombinationstherapie in aktuellen Therapieprotokollen 3.) Apoptosesensitivität gegenüber Doxorubicin. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass bei den untersuchten Zelllinien, deren Tumorentitäten in aktuellen Chemotherapieprotokollen

mit der Kombination aus Anthrazyklinen und Vinca-Alkaloiden behandelt werden 75 % der Zelllinien (9/12) den Apoptose-inhibierenden Effekt von Doxo in Kombination mit VCR zeigten. Von den Zelllinien, die nicht mit der Chemotherapie-Kombination behandelt werden zeigten 100% (13/13) den Antagonismus. Aufgeteilt nach Tumorentitäten zeigte sich bei 100% (4/4) der mesenchymalen, 100% (1/1) der neuroektodermalen, 100% (11/11) der epithelialen und 66,7% (6/9) der hämatopoetischen Tumorzellen der Antagonismus. Es erfolgte eine Aufteilung in Doxo-sensible und Doxo-resistente Zelllinien, wobei Doxo-Resistenz als spezifische Apoptose <10% definiert wurde. Bei Doxo-sensiblen Zelllinien zeigte sich der Antagonismus bei 88% (20/23), bei Doxo-resistenten bei 100% (2/2) der untersuchten Zelllinien.

4.2. Der VCR-vermittelte Apoptosesignalweg und die Inhibition durch Doxo

Um die Ursache der Hemmung des VCR-induzierten Zelltodes durch Doxo zu ermitteln, wurden die wichtigsten intrazellulären Proteine des Apoptosesignalweges von VCR untersucht. Hierzu wurde mittels Western Blot und mit Hilfe spezifischer Antikörper die Expressionsstärke der Proteine der proximalen und distalen Apoptosesignalkaskade nach Stimulation mit VCR, Doxo und deren Kombination auf SHEP- und A498-Zellen untersucht.

Aus der einschlägigen Literatur ist bekannt, dass zur initialen Signaltransduktion der Apoptoseinduktion durch VCR die Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL, die Phosphorylierung von Kinasen wie JNK, die Stabilisierung von p53 und die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges gehören (Blagosklonny et al., 1997, Giannakakou et al., 2002, Poruchynsky et al., 1998).

Zunächst wurde JNK untersucht, das eine wichtige Rolle in der initialen Transduktion des pro-apoptotischen Signals von Substanzen, die durch Mikrotubuli-Interaktion die Zellproliferation hemmen, spielt (Yamamoto et al., 1999). Seine Phosphorylierung als proximalster Schritt der VCR-induzierter Signalkaskade blieb bei der Kombination mit Doxo unbeeinflusst (Abb. 13).

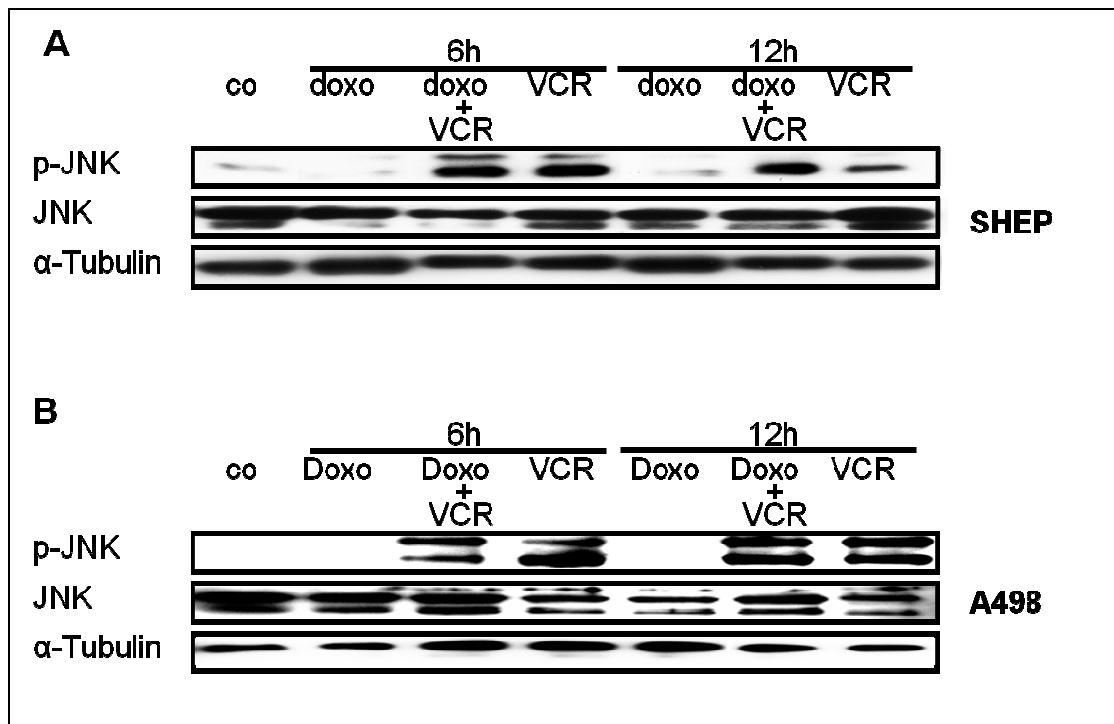
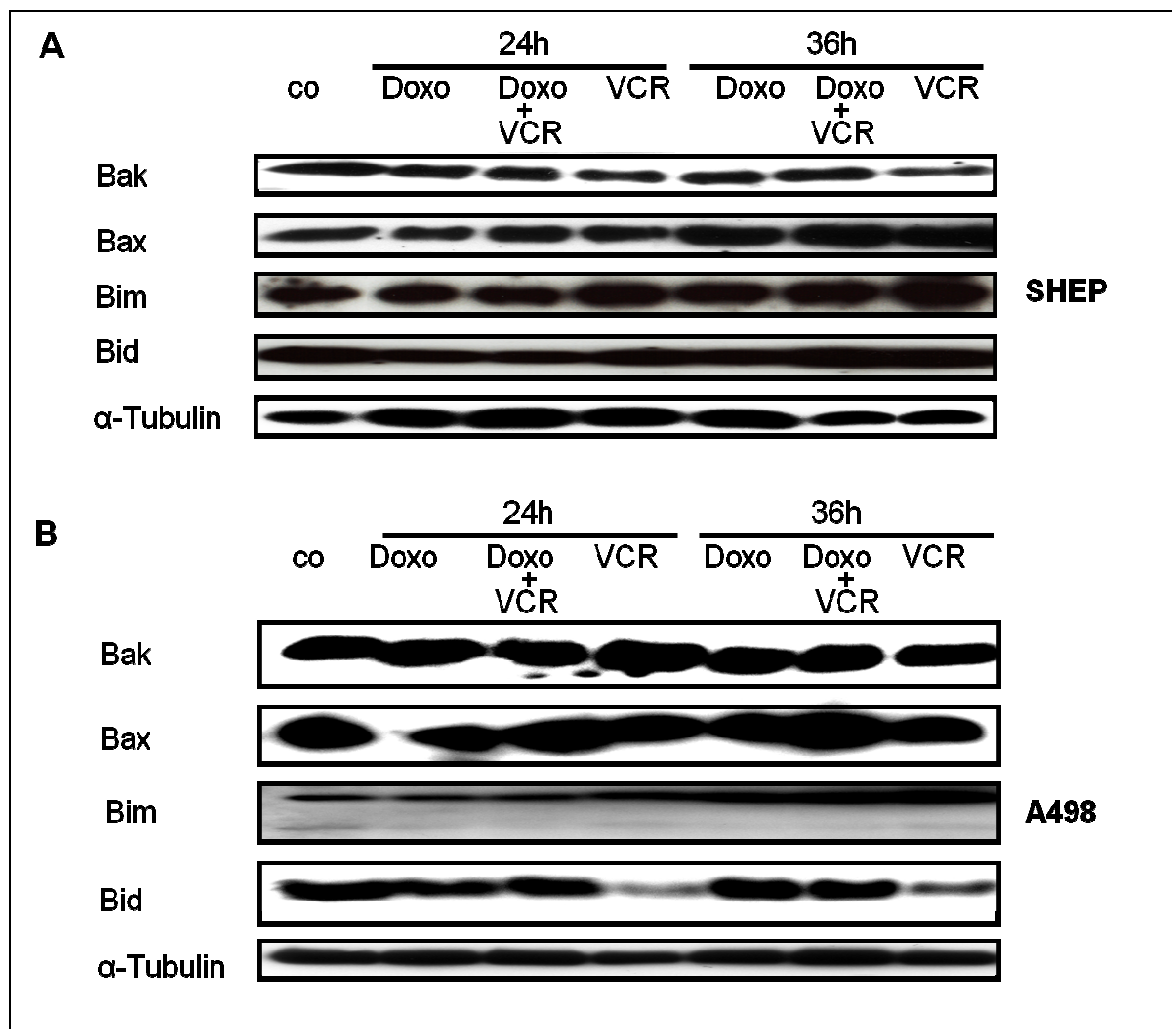


Abb.13: Keine Veränderung der JNK-Phosphorylierung bei Kombinationstherapie mit Doxo und VCR. Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Phosphorylierung von JNK. Die Zellen wurden mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurde JNK und phosphoryliertes JNK=p-JNK detektiert. Als Ladekontrolle diente α-Tubulin. Co=unbehandelte Kontrolle.

4.2.1. Doxo hemmt die Phosphorylierung pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie

Als nächster Schritt wurden die Proteine der Bcl-2-Familie untersucht, die aus pro- (Bak, Bax, BIM, Bid) und anti-apoptotischen (Bcl-2 und Bcl-xL) Mitgliedern besteht. Deren Aktivierung stellt gleichzeitig einen der proximalsten Schritte der intrinsischen Apoptose-Signalkaskade dar. Durch Aktivierung sog. JNK-Kinasen führt VCR mittels Phosphorylierung zu einer Inaktivierung von Bcl-2 und Bcl-xL und antagonisiert so deren anti-apoptotischen Effekt (Blagosklonny et al., 1997, Poruchynsky et al., 1998). Somit kann Cytochrom C, ein Protein der Atmungskette, vom Mitochondrium ins Zytosol freigesetzt werden, welches im nächsten Schritt zusammen mit APAF-1 und Procaspase-9 das sog. Apoptosom formt und weitere Caspasen aktiviert und damit die Effektorkaskade der Apoptose initiiert (Hengartner, 2000, Kroemer et al., 2007). In Abbildung 14 A-B ist dargestellt, dass es im Bezug auf die Expressionsstärke der proapoptotischen Proteine Bak, Bax, BIM und Bid der Bcl-2-Familie keinen

Unterschied zwischen einer Stimulation der Zellen mit VCR oder der Kombination mit Doxo gab. Für das pro-apoptotische Bid zeigte sich für die A498 Zellen eine Abnahme der Proteinkonzentration nach alleiniger Stimulation mit VCR, die durch die Spaltung von Bid im Rahmen der Apoptoseinduktion zu erklären ist und bei der Kombinationstherapie nicht stattfand. Allerdings wird durch die Kombination mit Doxo die VCR-induzierte Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL gehemmt (Abb. 14 C-D). Dies stellt möglicherweise den entscheidenden Schritt in der durch Doxo verhinderten weiteren Signaltransduktion des Apoptosesignals dar, da durch die fehlende Phosphorylierung antiapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder deren Inaktivierung ausbleibt.



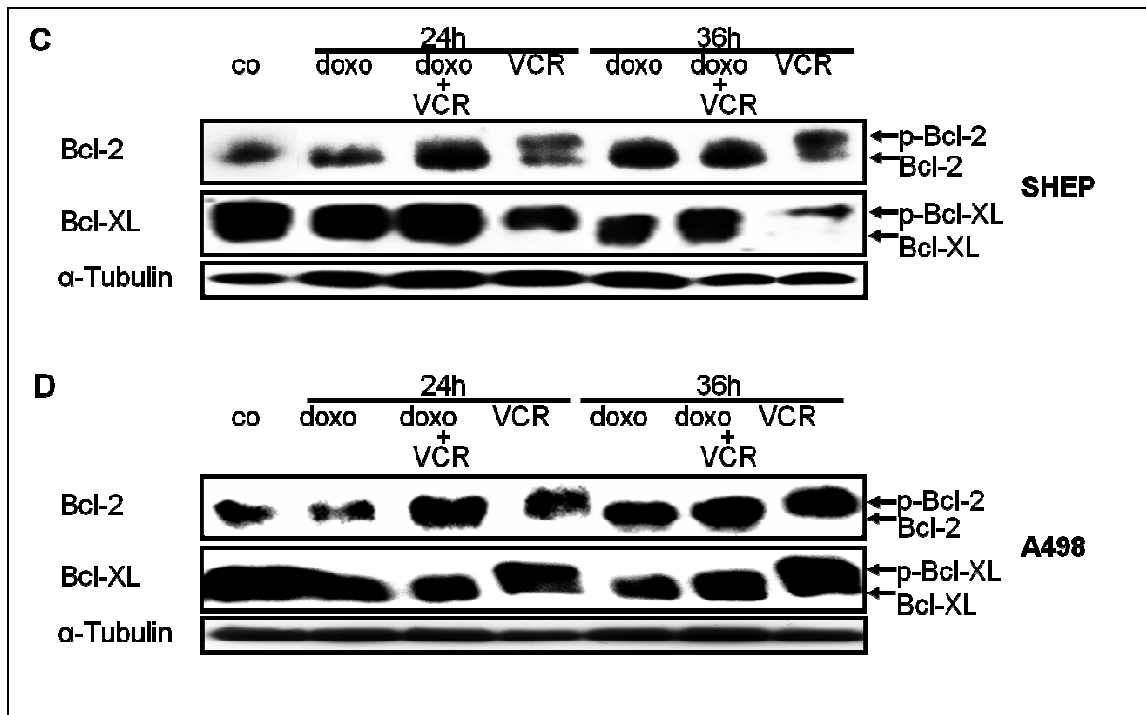


Abb. 14: Inhibition der Phosphorylierung der antiapoptotischen (C-D) Mitglieder der Bcl-2-Familie bei unveränderter Expression der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie (A-B). Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Aktivierung/Phosphorylierung von Proteinen der Bcl-2-Familie. SHEP-Zellen (**A und C**) und A498-Zellen (**B und D**) wurden stimuliert mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden Bak, Bax, Bim und Bid, sowie Bcl-2 und Bcl-xL und die Phosphorylierung (=p) von Bcl-2 und Bcl-xL über das höhere Molekulargewicht bei der elektrophoretischen Auftrennung detektiert. Als Ladekontrolle diente α-Tubulin. Co=unbehandelte Kontrolle.

4.2.2. Doxo hemmt den Verlust des Mitochondrienmembranpotentials

Wie oben beschrieben kommt dem Mitochondrium in der Apoptosesignalkaskade eine sehr wichtige Rolle zu. Da die vorgehenden Untersuchungen eine Verhinderung der Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL durch VCR bei Kombination mit Doxo zeigte, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob diese Veränderungen auch einen Einfluss auf den Verlust des Mitochondrienmembranpotentials (MMP), also eine ausbleibende Porenbildung in der Mitochondrienmembran haben. Das MMP und damit der elektrochemische Protonengradient über der Mitochondrienmembran stellt den Antrieb für die ATP-Bildung des Mitochondriums als Energielieferant für die Zelle dar (Green und Reed, 1998, Kroemer et al., 2007). Abbildung 15 zeigt, dass der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials nach Stimulation mit VCR alleine über 48 h kontinuierlich anstieg. Nach Stimulation mit Doxo und der Kombination

beider Zytostatika kommt es erst nach 36 h zu einem viel späteren und deutlich geringeren Anstieg. Nach 48 Stunden war der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials durch VCR 5-mal so hoch im Vergleich zu Doxo alleine und der Kombination aus beiden Substanzen.

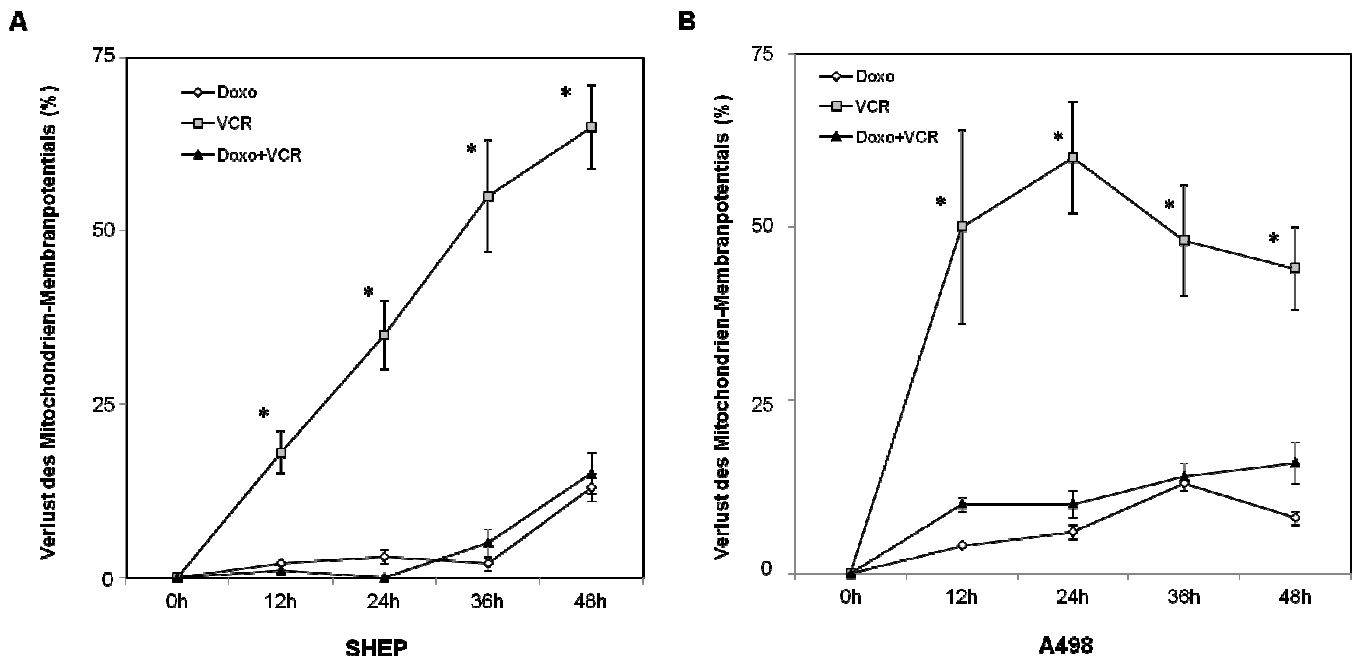
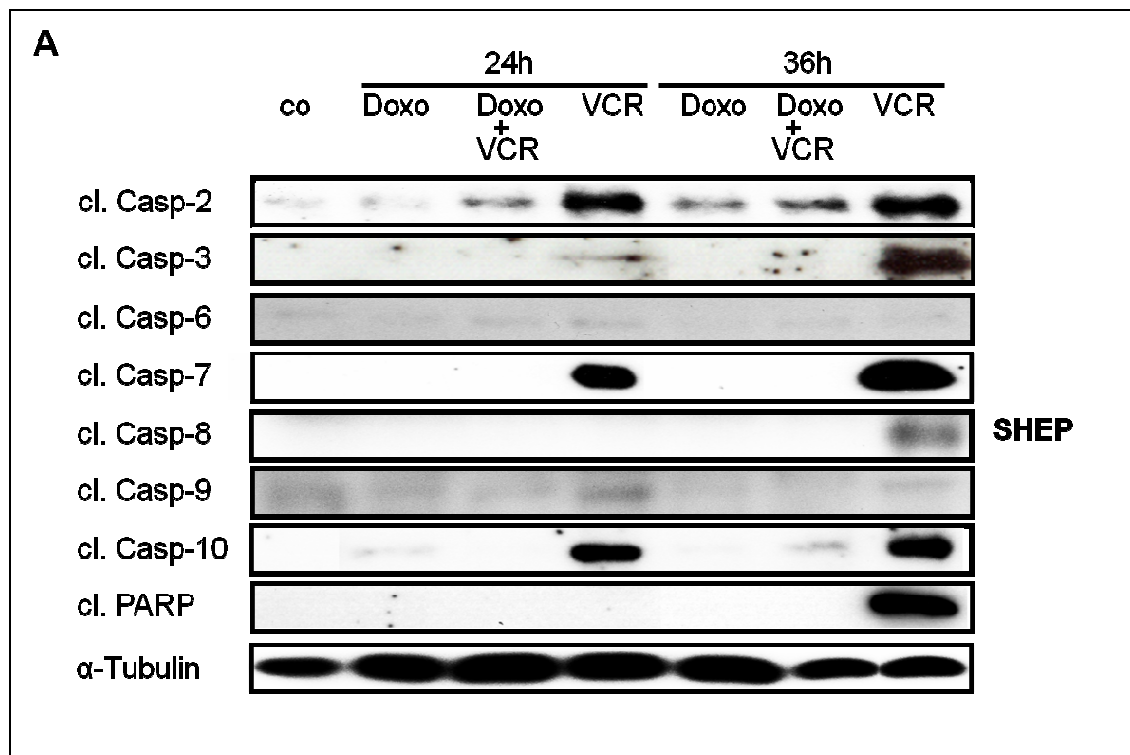


Abb. 15: Verringerter Verlust des Mitochondrienmembranpotentials nach kombinierter Stimulation mit Doxorubicin und Vincristin . SHEP-Zellen (**A**) und A498-Zellen (**B**) wurden stimuliert mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination. Der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials wurde mittels FACScan über DiOC₆-Färbung nach den angegebenen Zeitpunkten detektiert. Darstellung der Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Experimenten ± SEM. * $p < 0,05$.

4.2.3. Reduzierte Caspasen-Aktivierung durch die Kombinationstherapie mit Doxo im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit VCR

Im Apoptosesignalweg distal des Mitochondriums werden nach Freisetzung von Cytochrom C und weiterer Apoptose-fördernder Faktoren Cystein-anhängige Proteinasen, sog. Caspasen aktiviert und führen somit zur Einleitung der Exekutionsphase der Apoptose der Zelle (MacKenzie und Clark, 2008). Beim intrinsischen Weg, über den VCR-induzierte Apoptose vermittelt wird, erfolgt meist zunächst die Aktivierung der Caspase-9, z.B. durch die Cytochrom-C-Freisetzung aus dem Mitochondrium, welche in einem nächsten Schritt die sog. Effektorcaspasen -3, -6 und -7 aktiviert (Zou et al., 1999). Abbildung 16 zeigt die Western Blot -

Analyse der aktiven Spaltprodukte der Caspasen (sog. cleaved Caspasen). Durch die Stimulation mit VCR alleine erfolgte auf SHEP-Zellen bereits nach 24 und verstärkt nach 36 h die Aktivierung der Caspasen -2,-3, -7 und -10, nicht aber von Caspase-6. Die Aktivierung von Caspase-8 konnte nach 36h vermutlich im Rahmen der überschießenden Aktivierung aller weiteren Caspasen nachgewiesen werden. Cleaved Caspase-9 war als Hinweis auf die frühe Spaltung nur zum Zeitpunkt 24 h nachweisbar. Im analogen Experiment mit A498-Zellen kam es nach 36 h zu einer Caspasen -2, -9 und -10-Aktivierung. Cleaved Caspase-6 konnte ebenfalls nach 36 Stunden nachgewiesen werden, somit scheinen Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Aktivierung der Effektorcaspasen zu bestehen.



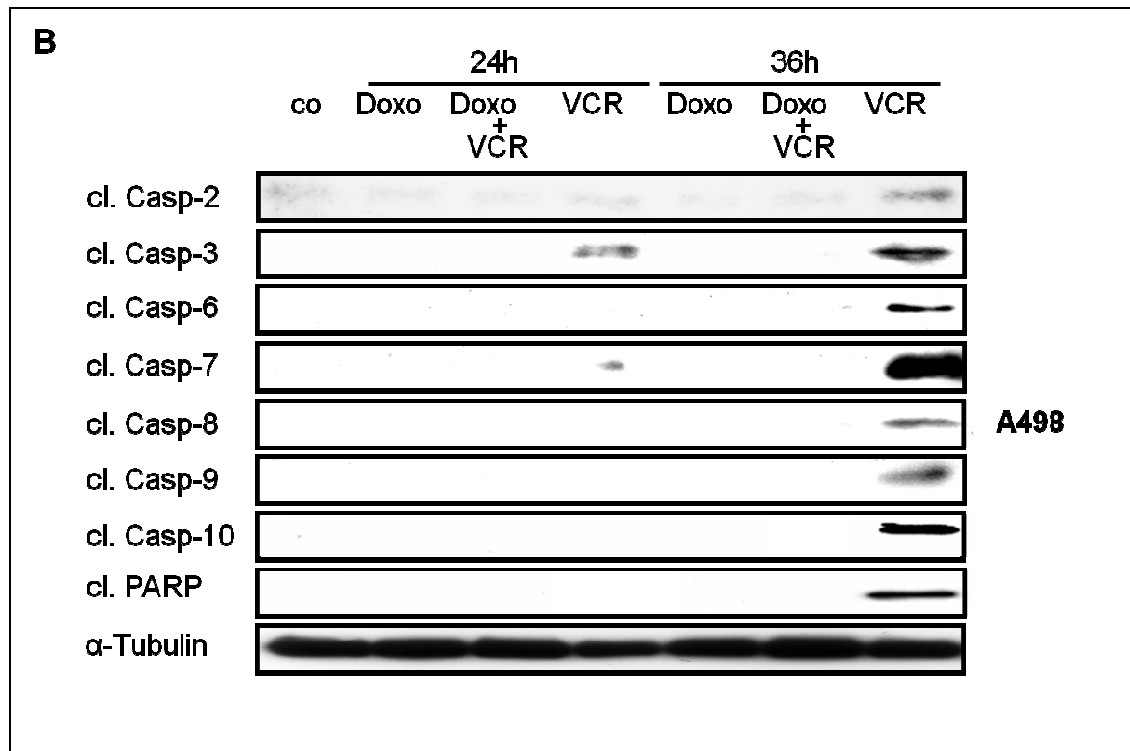


Abb. 16: Inhibition der Caspasen-Aktivierung bei Kombinationstherapie von Doxo plus VCR. Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Aktivierung von Caspasen. SHEP-Zellen (**A**) und A498-Zellen (**B**) wurden stimuliert mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden die aktiven Spaltprodukte von Caspasen (*cl. Casp.* = *cleaved Caspase*) und PARP detektiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Co=unbehandelte Kontrolle.

Neben der Aktivierung und Spaltung durch Caspasen im Apoptose-Signalweg erfüllt PARP unter moderatem zellulärem Stress vor allem eine Rolle im DNA-Reparatursystem als Detektor von DNA-Strangbrüchen (Kaufmann et al., 1993, Koh et al, 2005). Als Ausdruck der Caspasen-Effektorfunktion im Rahmen der Apoptoseinduktion erfolgte nach 36h die proteolytische Spaltung von PARP (*poly-ADP-ribose polymerase*), sog. *cleaved PARP* durch VCR, nicht aber durch Doxo oder die Kombination (Abb. 16).

Doxo alleine führte nicht zu einer Caspasen-Spaltung und damit nicht zu einer Aktivierung des distalen Apoptosesignalweges.

4.2.4. Antiapoptotische Proteine der IAP-Familie

Eine inhibitorische Rolle in der Apoptosekaskade distal des Mitochondriums kommt den Proteinen der IAP-Familie zu, indem sie die Wirkung von Caspasen inhibieren (Tamm et al, 1998). Die Regulation der Proteine der IAP-Familie (XIAP, cIAP-1, cIAP-2) zeigte nach Stimulation mit VCR, Doxo und der Kombination keine Unterschiede in der Expressionstärke auf Proteinebene. Hingegen kam es zu einer erhöhten Expression von Survivin nach alleiniger Stimulation mit VCR über 24 h und 36 h. Nach Stimulation mit Doxo und der Kombination kam es zu keiner vermehrten Expression (Abb. 17).

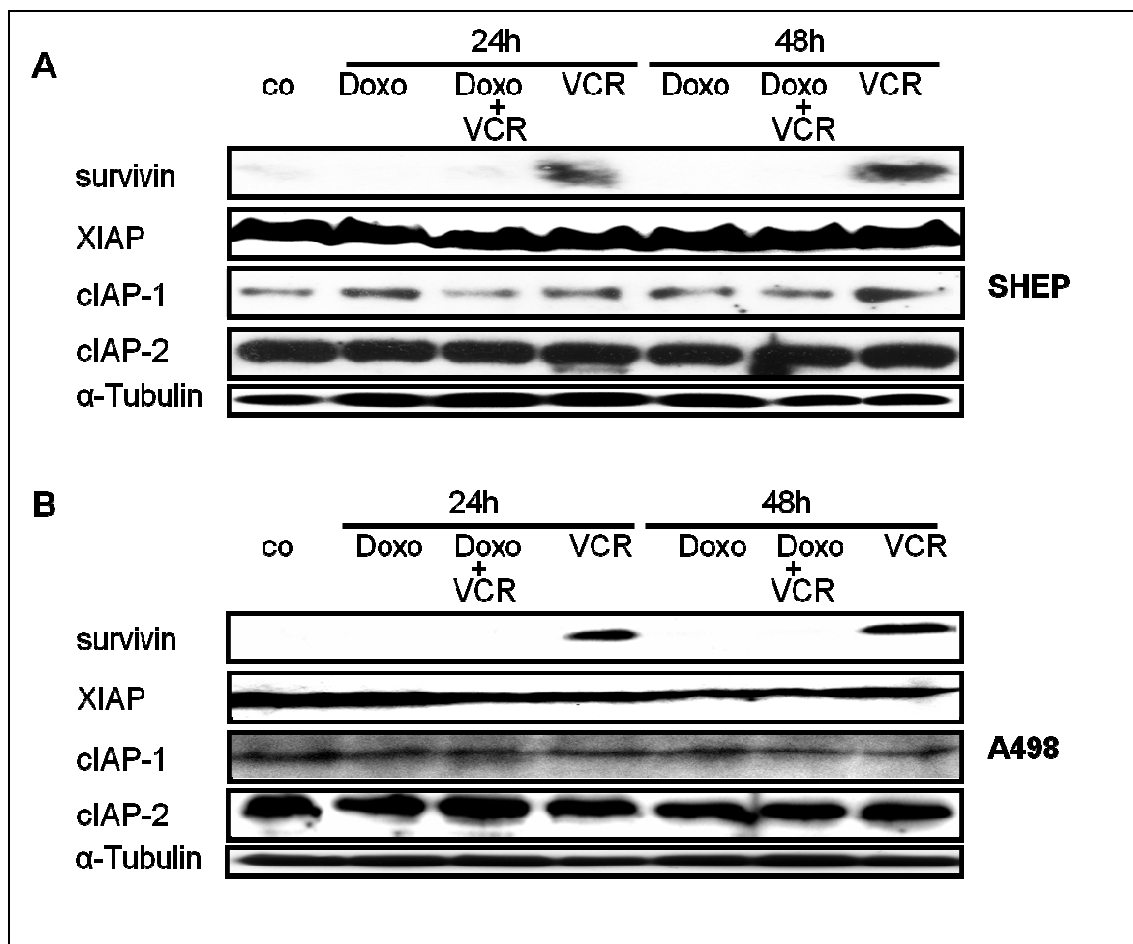


Abb. 17: Erhöhte Expression von Survivin nach alleiniger Stimulation mit Vincristin. Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Expressionsstärke antiapoptotischer Proteine der IAP-Familie. SHEP-Zellen (A) und A498-Zellen (B) wurden stimuliert mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden Survivin, XIAP, cIAP-1 und cIAP-2 detektiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Co=unbehandelte Kontrolle.

Kein Einfluss der Überexpression von Survivin auf die Apoptoseinduktion der Kombinationstherapie von VCR plus Doxo

Survivin stellte unter den inhibitorischen Proteinen der IAP-Familie eine Ausnahme dar, da es nur durch die alleinige VCR-Applikation, nicht aber durch Doxo alleine oder unter der Kombinationstherapie hochreguliert wurde. Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob durch die Transfektion mittels eines Expressionsplasmides und damit einhergehender Überexpression von Survivin der Antagonismus bei SHEP- und A498-Zellen aufgehoben oder vermindert werden konnte.

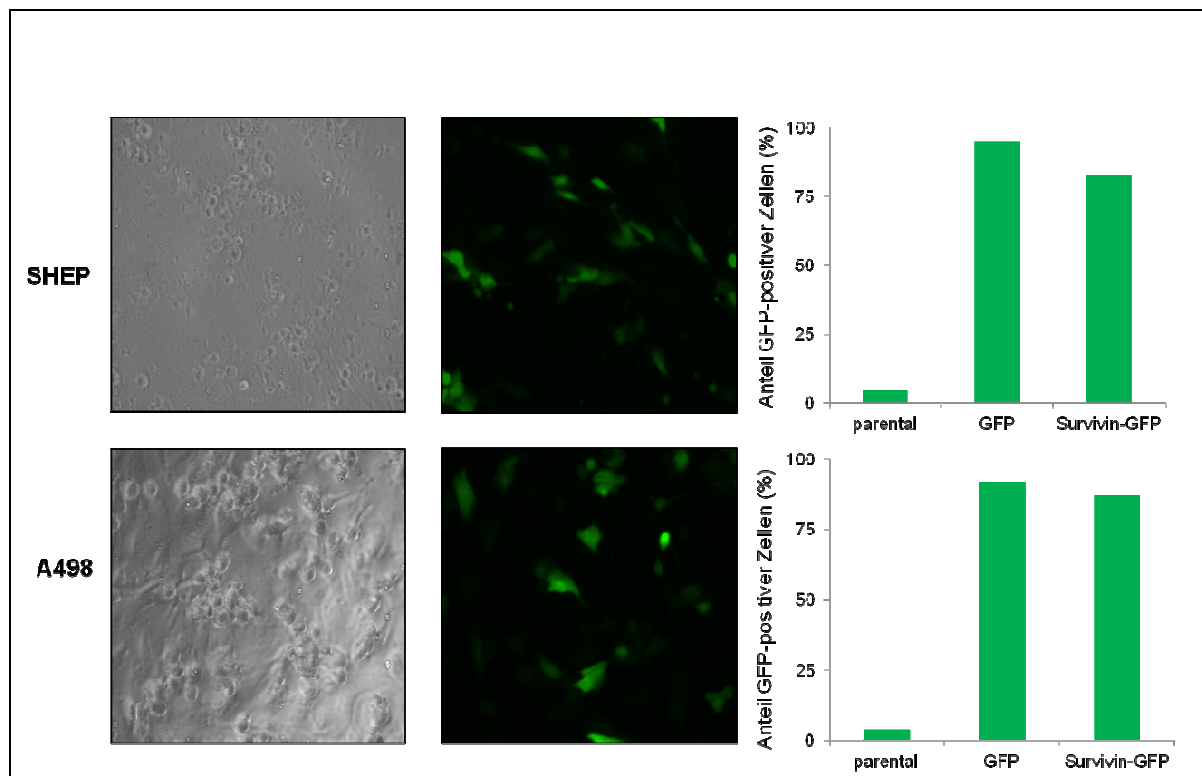


Abb. 18: Nachweis des Transfektionserfolges von Survivin-GFP. Fluoreszenzmikroskopie und FACScan-Analyse zur Detektion GFP-positiver Zellen. SHEP- und A498-Zellen wurden mit einem Survivin-GFP-Fusionsplasmid, bzw. GFP transfiziert wie in 3.2.4.3. beschrieben. Anschließend erfolgte nach 24h der Nachweis der GFP-positiven Zellen im Fluoreszenzmikroskop (links), sowie die Berechnung des Anteiles der GFP-positiven Zellen per FACScan-Analyse (rechts).

Zur Überwachung der Transfektionseffizienz bei transienter Transfektion wurde ein an GFP-gekoppeltes Survivin verwendet. Wie in 3.2.7.2. beschrieben ist GFP ein grün fluoreszierendes Protein, welches durch die Koppelung an andere Proteine deren Position in der Zelle sichtbar machen kann. Die erfolgreiche Transfektion konnte im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen und per FACScan-Analyse die Transfektionseffizienz berechnet werden (Abb. 18). Es wurde ein GFP-Survivin-

Konstrukt verwendet, welches bereits vielfach in Publikationen verwendet wurde, effizient transfiziert wurde und von dem bekannt ist, dass es zu einer starken Expression führt und dass es funktionell aktiv ist (Ambrosini et al., 1997).

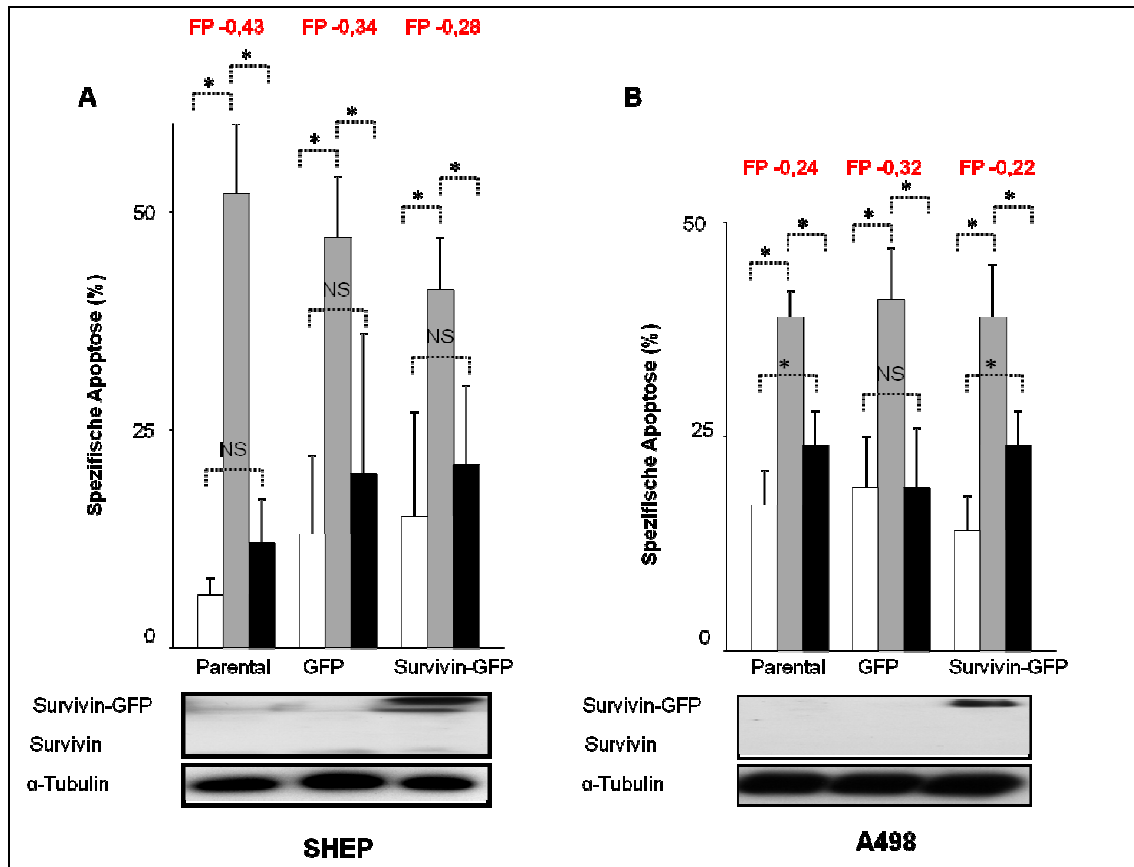


Abb. 19: Kein Einfluss der Überexpression von Survivin auf die Apoptoseinduktion der Kombinationstherapie von Doxo und VCR. FACSscan-Apoptoseanalyse und Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Antagonismus nach Überexpression von Survivin. SHEP-Zellen (**A**) und A498-Zellen (**B**) wurden mit shRNA Survivin (an GFP gekoppelt) oder dem Kontrollplasmid (GFP) transfiziert oder unbehandelt belassen (Parental). Mittels eines Antikörpers gegen Survivin wurde an GFP-gekoppeltes Survivin nach 24 h detektiert, das aufgrund der größeren Größe des Gesamtproteins oberhalb von Survivin in der elektrophoretischen Auftrennung läuft. Als Ladekontrolle diente α-Tubulin. 24h nach Transfektion wurden die Zellen mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert und nach weiteren 48 h erfolgte die FACSscan-Analyse mittels Nicoletti-Färbung. In roter Schrift sind die Werte des Fractional Product (FP) <0,1 angegeben, welche einen antagonistischen Effekt widerspiegeln. Darstellung der Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Experimenten ± SEM. * $p < 0,05$, NS=nicht signifikant.

Nach erfolgreicher Transfektion wurde die Überexpression von Survivin zusätzlich mittels Westernblot nachgewiesen. Der Unterschied zwischen Vincristin-induzierter Apoptose und der Apoptoserate durch die Kombination aus VCR und Doxo zeigte sich auch nach Transfektion weiterhin statistisch signifikant. Zudem konnte per

'fractional product' (FP) bestätigt werden, dass weiterhin eine weitgehend unveränderte antagonistische Interaktion durch die Kombinationstherapie bestand. Die Überexpression von Survivin oder dem Kontrollplasmid hatte keinen Einfluss auf die durch Doxo vermittelte Hemmung der VCR-Induzierten Apoptose, was nahe legt, dass es sich lediglich um ein Begleitphänomen handelt, welches im Rahmen des Antagonismus keine Rolle zu spielen scheint (Abb. 19).

Zusammenfassend konnte mittels Western Blot gezeigt werden, dass Doxo einen der proximalsten Schritte der VCR-induzierte Apoptosesignalkaskade, die Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL hemmt, während die JNK-Phosphorylierung durch VCR nicht beeinflusst wird. Es wurde nachgewiesen, dass der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials als zentrale Regulation der intrinsischen Apoptosinduktion und die VCR-induzierte Caspasen-Spaltung und damit Aktivierung der distalen Apoptosesignalkaskade durch Doxo gehemmt wird.

4.3. Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 in der Doxo-vermittelten Apoptosesignaltransduktion

Um den Angriffspunkt von Doxo in der Apoptosesignalkaskade zu ermitteln wurden in einem nächsten Schritt die Aktivierungspunkte der Signaltransduktion durch Doxorubicin untersucht. Es ist seit Langem bekannt, dass Doxorubicin als interkalierende Substanz in erster Linie über DNA-Schädigung zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 führt (Gerwitz, 1999, Minotti et al., 2004). Wichtige Zielgene sind unter anderem Proteine der Zellzykluskontrolle, wie z.B. p21. Über p53 führt p21 zum Zellzyklusarrest und damit zur Apoptose (Giono und Manfredi, 2006). Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Westernblot-Untersuchung der Zellkernfraktionen. Wie hier zu sehen ist, kam es durch die Stimulation mit Doxorubicin nach 6 h zu einer Akkumulierung von p53 im Zellkern, welche nach 12 h noch ausgeprägter war. Diese Akkumulierung blieb auch nach gleichzeitiger Stimulation mit VCR erhalten. Zudem kam es zu einer vermehrten Ansammlung von p21 als direktem Zielprotein von p53 nach Applikation von Doxo und der Kombination. Die Aktivierung von p21 erfolgte bei beiden Zelllinien verzögert im Vergleich zu p53 und erst nach 12 Stunden.

Als weiterer Transkriptionsfaktor, der durch Doxo beeinflusst werden kann, wurde NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) untersucht

(Bian et al., 2001, Wang et al., 2002). NFκB ist als Transkriptionsfaktor beteiligt an Immunantwort und Entzündungsreaktion und reguliert darüber hinaus die Transkription vieler antiapoptotischer Proteine. Zudem spielt NFκB eine wichtige Rolle in der Antwort der Zelle auf DNA-Schädigung. Die NFκB-Familie besteht aus mehreren Proteinen, darunter p65 und p100, die homo- und heterodimere Komplexe bilden und über den klassischen und alternativen Weg ihre Wirkung entfalten können (Karin et al., 2002, Karl et al., 2009). Wie Abbildung 20 zeigt, kam es im Gegensatz zu p53 und p21 zu keiner Veränderung der Expression von NFκB p65 und NFκB p100.

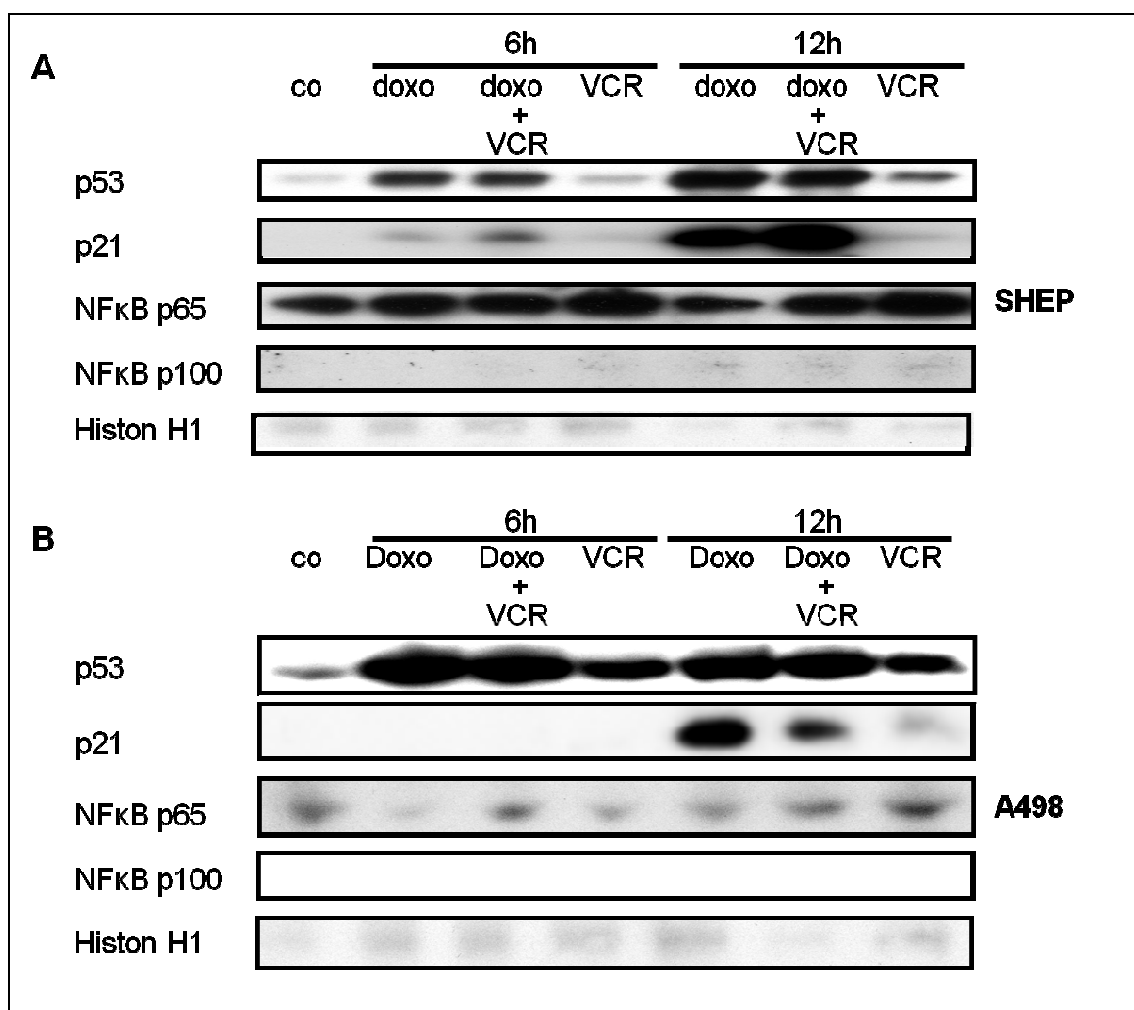


Abb. 20: Nukleäre Akkumulation von p53 und p21 nach Stimulation mit Doxo alleine oder in Kombination mit VCR. Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Aktivierung von Proteinen der Kernfraktion. SHEP-Zellen (A) und A498-Zellen (B) wurden stimuliert mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden p53, p21 und NFκB p65 bzw. p100 detektiert. Als Ladekontrolle diente Histone H1. Co=unbehandelte Kontrolle.

Durch den Verlust von p53 kann der antagonistische Effekt von Doxo auf die VCR-induzierte Apoptose überwunden werden

Die Ergebnisse zeigen, dass Doxorubicin in dem gewählten experimentellen Setting zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 führte. In der Folge wurde nun weiter untersucht, ob p53 für den antagonistischen Effekt von Doxo auf die VCR-induzierten Apoptose verantwortlich ist. Hierfür wurde versucht in diversen Experimenten p53 mittels Transfektion von shRNA oder siRNA zu inhibieren.

Zunächst wurde versucht mittels eines Transfektionsregimes mit siRNA p53 einen effektiven *knockdown* von p53 herbei zu führen.

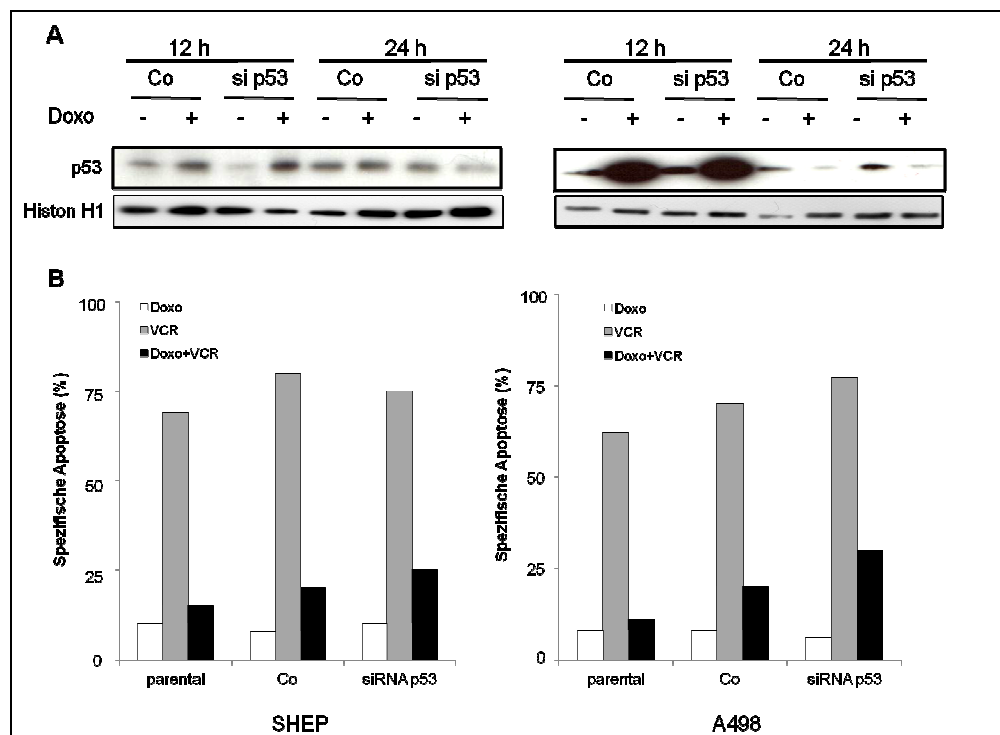


Abb. 21: Kein effektiver *knockdown* von p53 mittels Transfektion mit siRNA Sequenzen.

FACScan-Apoptoseanalyse und Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Auswirkung einer Transfektion mit siRNA p53. SHEP- und A498-Zellen wurden mit siRNAp53 oder All Star negative control siRNA (Co) zur Kontrolle transfiziert oder unbehandelt belassen (parental). Für die Western-Blot-Analyse (**A**) wurden die Zellen nach 6 mit Doxo stimuliert und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Mittels eines spezifischen Antikörpers erfolgte der Nachweis von p53. Als Ladekontrolle diente Histone H1n. Für die FACScan-Analyse (**B**) wurden die Zellen 24h nach Transfektion mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert und nach weiteren 48 h erfolgte die FACScan-Analyse mittels Nicoletti-Färbung. Dargestellt ist ein Einzelexperiment.

Wie Abbildung 21 zeigt gelang durch die Verwendung einer siRNA gegen p53 kein effektiver *knockdown* und der Antagonismus war unverändert vorhanden. Unter der Arbeitshypothese, dass p53 zu stark exprimiert wird, um einen effizienten transienten *knockdown* zu erreichen, wurde nun versucht auf ein System mit stabiler Transfektion zu wechseln.

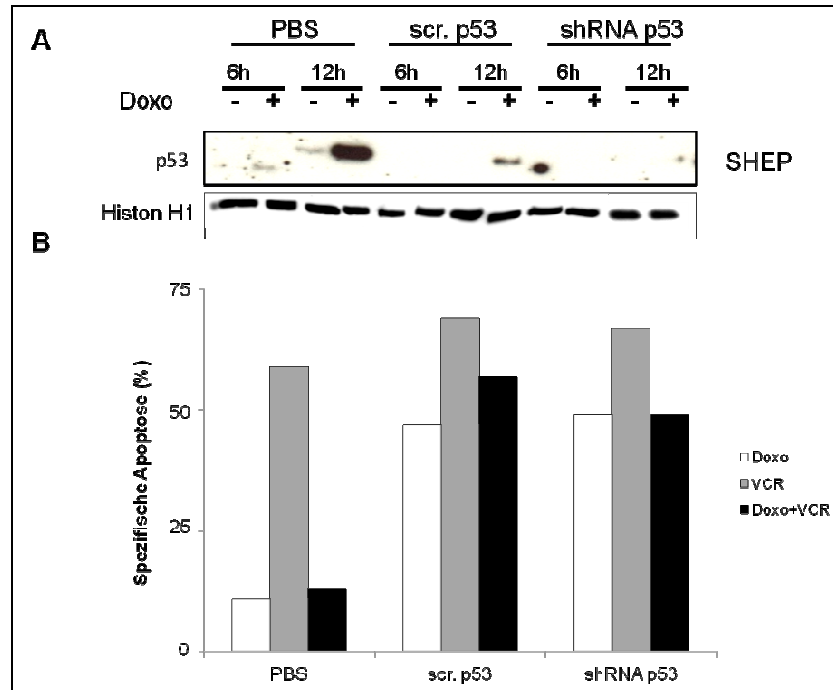


Abb. 22: Erhöhte Doxo-Toxizität und Inhibition der p53 Aktivierung durch die *scrambled* Sequenz (scr. p53) und nach *knockdown* von p53 mittels shRNA. FACScan-Apoptoseanalyse und Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Auswirkung einer Transfektion mit shRNA p53. SHEP-Zellen wurden mit shRNAp53 oder dem Kontrollplasmid (*scrambled* p53) oder PBS zur Kontrolle transfiziert. Für die Western-Blot-Analyse (**A**) wurde die Zellen nach 6 und 12 h mit Doxo stimuliert. Mittels eines Antikörpers wurde p53 wurde nach 24 h detektiert. Als Ladekontrolle diente Histone H1. Für die FACScan-Analyse (**B**) wurden die Zellen 24h nach Transfektion mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml) oder der Kombination stimuliert und nach weiteren 48 h erfolgte die FACScan-Analyse mittels Nicoletti-Färbung. Dargestellt ist ein Einzelexperiment.

Durch die Transfektion mit shRNA p53 gelang zwar ein *knockdown* von p53, allerdings kam es auch schon durch die Transfektion mit der Kontrollsequenz (*scrambled* p53) zu einer Interferenz mit p53 und zumindest Verminderung der Expressionsstärke nach Doxo-Stimulation im Vergleich zur Transfektion mit PBS. Zudem zeigte sich in der FACScan-Apoptoseanalyse eine hohe Spontanapoptoserate von bis zu 70% durch die Transfektion und eine spezifische

Apoptoserate durch Doxorubicin von fast 50%, sodass hierdurch keine valide Aussage über den Antagonismus getroffen werden konnte (Abb. 22).

Das Inhibieren von p53 mittels shRNA oder siRNA gelang leider im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der technischen Schwierigkeiten nicht. Es zeigte sich, dass die Transfektion mit siRNA zu keinem effizienten *knockdown* führte, das verwendete *hairpin*-Konstrukt jedoch die Apoptoseinduktion durch Doxo erhöhte und parallel die Aktivierung von p53 nach Doxo inhibierte.

Es wurden daher im Weiteren Zellen verwendet, welche durch homologe Rekombination bereits kein p53 mehr besitzen. Dies waren die Colonkarzinom-Zelllinie HCT116, welche vielfach für Fragestellungen zur Bedeutung von p53 wegen dem kompletten Fehlen von p53 verwendet werden (Bunz et al., 1998). In den HCT116 Zellen mit Verlust von p53 konnte der antagonistische Effekt von Doxo auf die VCR-induzierte Apoptose verhindert werden. Stattdessen zeigte sich mittels „fractional product“-Analyse ein additiver Effekt (Abb. 23).

p53 kann als Reaktion auf zellulären Stress und DNA-Schädigung über die vermehrte Expression des CDK-Inhibitors p21 zum Zellzyklusarrest führen (El-Deiry et al., 1994). In Abbildung 20 konnte gezeigt werden, dass es auch bei der Kombination von Doxo und VCR zu einer Akkumulierung von p21 im Zellkern kam. Daher wurden zusätzlich HCT116-Zellen mit Verlust von p21 untersucht, welche analog zu den p53-defizienten Zellen durch homologe Rekombination entstanden waren (Bunz et al., 1998). Es zeigte sich wie schon für p53, dass dadurch der Antagonismus aufgehoben werden konnte (Abb. 23).

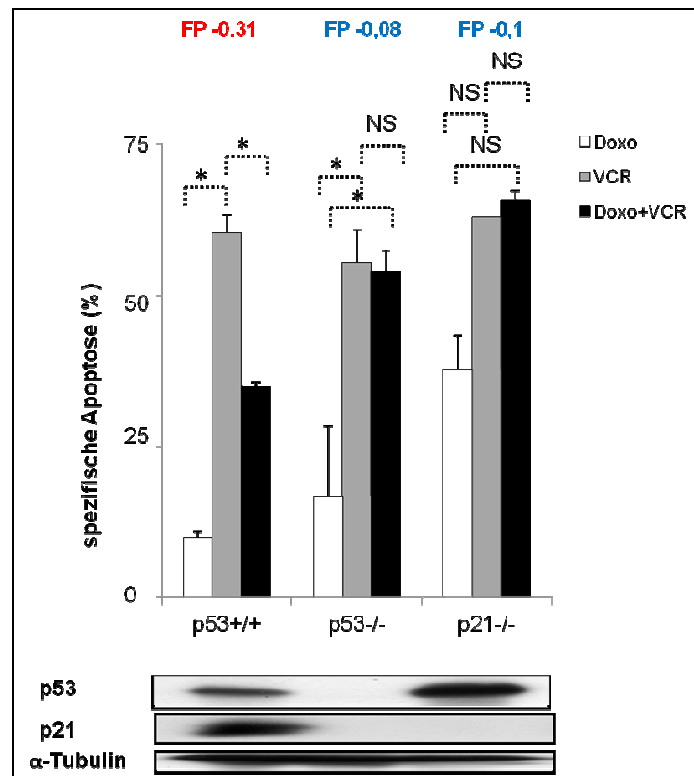


Abb. 23: Verhinderung des Antagonismus bei Kombination von Doxorubicin und Vincristin auf p53- und p21- defizienten HCT 116-Zellen. FACSscan-Apoptoseanalyse und Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Antagonismus bei Fehlen von p53 bzw. p21. Parentale HCT116-Zellen (p53+/+), sowie solche mit Verlust von p53 (p53-/-) oder p21 (p21-/-) durch homologe Rekombination wurden mit VCR (30 ng/ml), Doxo (60 ng/ml) oder der Kombination stimuliert und nach 96 h mittels FACSscan-Analyse und Nicoletti-Färbung die spezifische Apoptose detektiert. Der Nachweis des Fehlens von p53 und p21 erfolgte per Westernblot mittels spezifischer Antikörper. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. In roter Schrift sind die Werte des fractional product (FP) <-0,1 angegeben, welche einen antagonistischen Effekt widerspiegeln; in blauer Schrift die Werte zwischen -0,1 und 0,1, welche einen additiven Effekt widerspiegeln. Darstellung der Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM. * $p < 0,05$, NS=nicht signifikant.

4.4. Ausgeprägter Zellzyklusarrest nach kombinierter Stimulation mit Doxo und VCR

Vincristin entfaltet seine antiproliferative Wirkung, indem es durch Interaktion mit Mikrotubuli die Zellproliferation in der Mitose hemmt (Mollinedo und Gajate, 2003). Dies legt nahe, dass VCR für die Zelltodinduktion einen aktiven Zellzyklus benötigt.

Dagegen kann es über DNA-Schädigung, wie sie durch zytostatische Chemotherapeutika wie Doxorubicin in der Zielzelle ausgelöst wird, im Zellzyklus zu

einem p53-vermittelten Zellzyklusarrest kommen (Giono und Manfredi, 2006). Es stellte sich somit die Frage, ob VCR auf Zellen, die über keinen aktiven Zellzyklus verfügen eine volle apoptotische Wirkung entfalten kann bzw. ob in dem gewählten experimentellen Setting Doxo einen Zellzyklusarrest auslöst.

Um die Zellzyklusverteilung nach der Stimulation mit den untersuchten Substanzen über die Zeit zu quantifizieren und zu vergleichen, wurde eine FACScan-Analyse mittels Propidiumiodid-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die lebenden Zellen in der G2/M-Phase nach den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h untersucht (Abb. 24). Es konnte festgestellt werden, dass sowohl VCR alleine, als auch Doxo alleine zu einer moderaten Erhöhung des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase führten. Für VCR alleine war die Erhöhung in G2/M nur vorübergehend und nahm nach 24 h wieder ab. Die Kombination beider Chemotherapeutika jedoch führte zu einem ausgeprägten und anhaltenden Anstieg in G2/M mit >80% der Zellen in der G2/M-Phase bei SHEP-Zellen und 60% bei A498-Zellen. Dieser persistierende Anstieg ist als Zellzyklusarrest in G2/M zu bewerten.

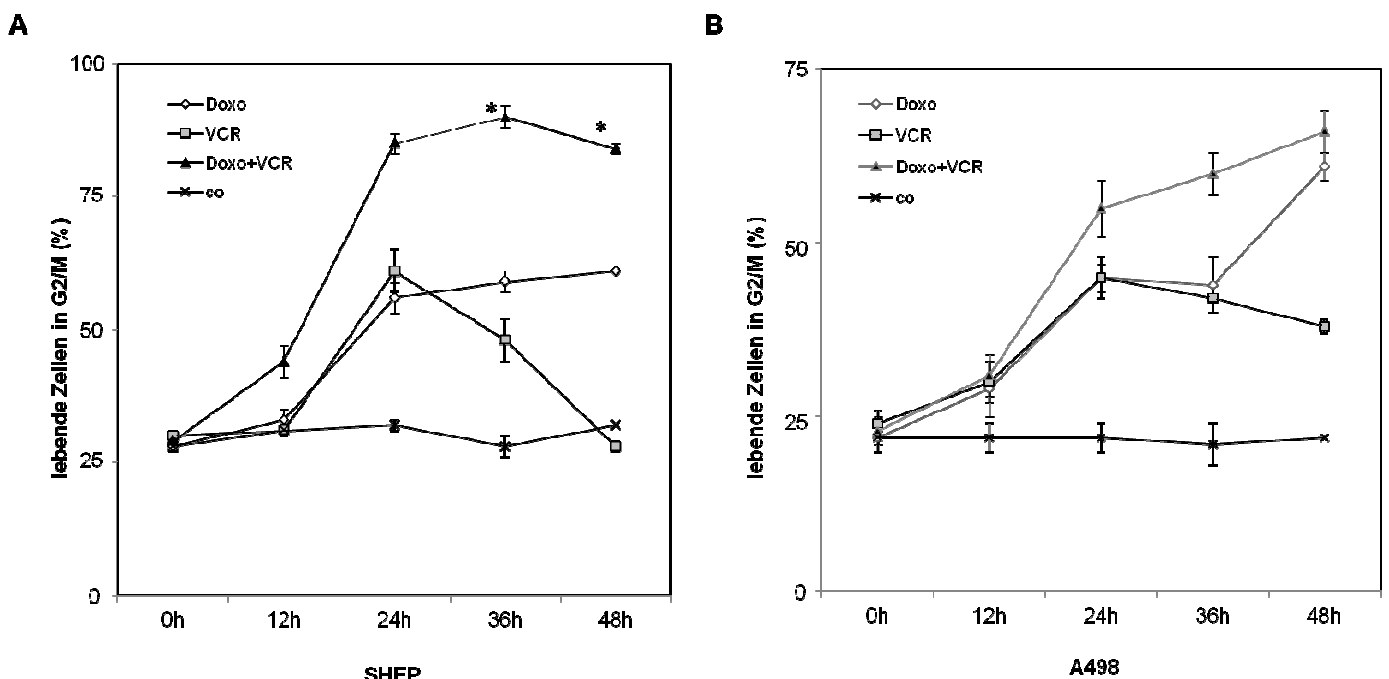


Abb. 24: Ausgeprägter Zellzyklusarrest in G2/M nach kombinierter Stimulation mit Doxorubicin und Vincristin. Zellzyklus-Analyse mittels FACScan. SHEP-Zellen (**A**) und A498-Zellen (**B**) wurden stimuliert mit VCR (300 ng/ml), Doxo (100 ng/ml), der Kombination, oder unbehandelt belassen (so=Kontrolle). Die Verteilung der lebenden Zellen in der G2/M-Phase wurde mittels FACScan nach den angegebenen Zeitpunkten detektiert. Darstellung der Mittelwerte aus n=3 unabhängigen Experimenten \pm SEM. * $p < 0,05$.

In Zusammenschau der Untersuchungen der Wirkung von Doxo auf VCR-induzierte Apoptose ist festzuhalten, dass im Einklang mit den Ergebnissen der veränderten Signaltransduktion von VCR während der Kombinationstherapie Doxorubicin zu einer Aktivierung von p53 und nachfolgend p21 führt und wie zu erwarten und in der Literatur vielfach beschrieben, diese Aktivierung mit einem Arrest des Zellzyklus in G2/M einhergeht (Bar-On et al., 2007, Lüpertz et al, 2010). Dieser Arrest ist vermutlich dafür verantwortlich, dass die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie Bcl-2 und Bcl-xL nicht mehr phosphoryliert werden können und die weitere Signaltransduktion der VCR-induzierten Apoptose verhindert wird.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den antagonistischen Wirkmechanismus zwischen Doxorubicin und Vincristin bezogen auf die induzierte Apoptose bei unterschiedlichen Tumorzelllinien näher zu charakterisieren und die daran beteiligten Vorgänge in der Apoptosesignaltransduktion zu identifizieren. Als einer der proximalsten Schritte in der Apoptosesignalkaskade, welcher durch die Kombinationstherapie inhibiert wurde, konnte die fehlende Phosphorylierung antiapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder identifiziert werden. Es gelang, die Doxorubicin-vermittelte Aktivierung von p53 und den nachfolgenden Zellzyklusarrest durch Doxorubicin als den möglicherweise entscheidenden Schritt bei der Antagonisierung der Vincristin-vermittelten Apoptose aufzuzeigen.

Im Folgenden soll die klinische Relevanz des dargestellten Antagonismus auch im Bezug auf Tumorentitäten, Reproduktion der Ergebnisse auf primären Patientenzellen und mit anderen Substanzklassen näher beleuchtet werden. Zudem erfolgt unter Einbeziehung weiterführender Daten der Arbeitsgruppe eine Darstellung der Rolle von p53 und Zellzyklusarrest und das Aufzeigen möglicher Strategien, den Antagonismus zu überwinden.

5.1. Historischer Rückblick

Chemotherapie wird seit den 1960er Jahren im Rahmen einer Polychemotherapie verabreicht, um damit die Effektivität der Therapie zu steigern und die Überlebensraten zu verbessern (Dy und Adjei, 2008, Frei, 1985). Es ist historisch bedingt, dass bisher kaum systematische Untersuchungen zur Optimierung dieser Substanzkombinationen durchgeführt wurden und vielfach nicht geklärt werden konnte, ob die simultane oder zeitversetzte Gabe oder welche Kombinationen von Zytostatika bei der jeweiligen Tumorerkrankung besonders wirkungsvoll und nebenwirkungsarm sind (Benz et al., 2007). Die molekularen Wirkmechanismen sowohl der Einzelsubstanzen als auch der Kombinationen sind noch unzureichend untersucht und verstanden und bedürfen daher weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen (Benz et al., 2007). Vinka-Alkaloide und Anthrazykline sind zwei der am häufigsten in der pädiatrischen Onkologie verwendeten Chemotherapeutika, welche für gewöhnlich am selben Tag innerhalb weniger Stunden verabreicht

werden (Bendal, 2011). Die Etablierung der Kombinationstherapie von Vincristin und Doxorubicin ist zurückzuführen auf Tierexperimente in den 1970er Jahren, welche allerdings mit einer sehr geringen Fallzahl (<10) durchgeführt wurden. Zudem wurden diese Experimente nur mit Maus- und Ratten-Tumorzellen durchgeführt (Goldin und Johnson, 1975, Zeller et al., 1975). Seither wurden weder klinische Studien zur Optimierung des Applikationsschemas noch weitere in vitro- oder in vivo-Untersuchungen bei menschlichen Tumorzelllinien durchgeführt.

5.2. Die antagonistische Interaktion zwischen Doxorubicin und Vincristin als neues Phänomen

Obwohl der Wirkantagonismus von Chemotherapie-Kombinationen in vitro kein neues Phänomen ist (Akutsu et al., 2002, Jensen et al, 1990, Kano et al., 1998), ist dies bisher erstaunlicherweise wenig untersucht. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass negative Ergebnisse nicht publiziert werden und primäres Ziel der Untersuchungen zumeist ist, durch neue Substanzen und neue Therapiekombinationen Vorteile für das Outcome der Patienten zu erwirken.

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation sowie in vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe erhobenen Daten zeigen erstmals, dass es bezogen auf die induzierte Apoptose durch die Ko-Applikation von Doxorubicin und Vincristin zu einem antagonistischen Wirkmechanismus der beiden Substanzen kommt (Kapitel 4.1).

Die Experimente dieser Arbeit wurden auf einer Neuroblastom-Zelllinie durchgeführt, da Neuroblastome in den gängigen Chemotherapie-Protokollen mit eben dieser Kombination behandelt werden. Durch Reproduktion ähnlicher Ergebnisse im Bezug auf den nachgewiesenen Antagonismus auf weiteren Tumor-Zelllinien unterschiedlicher Entität konnten die breite klinische Relevanz dieser neuen Beobachtung untermauert werden. Bei 75% (9/12) der Zelllinien, die aktuell in der Klinik mit der Kombination behandelt werden trat ein antagonistischer Effekt von Doxo auf die VCR-induzierte Apoptose auf. Darunter waren zusätzlich zur schon beschriebenen Neuroblastom-Zelllinie hämatopoetische Zelllinien wie akute lymphatische und myeloische Leukämien, sowie Lymphome und Ewing-Sarkom-Zelllinien. Zu den Zelllinien, welche keinen Antagonismus zeigten, gehörte eine T-

ALL-Zelllinie, sowie 2 von 4 (50%) der untersuchten B-ALL-Zelllinien. Die heterogene Wirkung auf die Leukämiezelllinien kann möglicherweise erklären, warum diese Medikamenteninteraktion bisher nicht beschrieben wurde. Die Daten zeigen jedoch zeitgleich, dass bei keiner der Zelllinien eine synergistische Wirkung nachgewiesen wurde, somit für Leukämiezelllinien kein Vorteil der simultanen Therapie im Vergleich zur zeitversetzten Gabe besteht, legt man die Berechnung der FP-Methode zugrunde.

5.3. Mögliche Strategien, den Antagonismus zu verhindern

5.3.1. Überwinden des Antagonismus durch zeitversetzte Applikation

Wenn nun die gleichzeitige Applikation der beiden Substanzen zu einer antagonistischen Apoptoseinduktion führt, stellte sich die Frage, ob eine zeitversetzte Applikation zu einer besseren Wirkung und Vermeidung der Medikamenteninteraktion führen kann. Für andere Medikamentenkombinationen wurde in der Literatur bereits ein antagonistischer Effekt bei simultaner Applikation beschrieben. Kano et al. (1998) untersuchten die Kombination von Paclitaxel und Methotrexat auf soliden Tumorzelllinien unterschiedlicher Entität und zeigten, dass es durch die simultane Applikation bei 50% (2/2) der Zelllinien zu einem additiven bis antagonistischen Effekt und bei 50% (2/2) der Zelllinien zu einem antagonistischen Effekt kam. Dieser Antagonismus bezogen auf die Zellproliferation konnte durch die Vorinkubation mit Paclitaxel überwunden werden. Hier zeigten in der Folge alle Zelllinien einen additiven Effekt. Wurde Methotrexat zuerst verabreicht zeigte sich bei 75% (3/4) eine synergistische Interaktion, bei 25% (1/4) ein additiver Effekt.

Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte für Methotrexat und Cytarabin, dass es auch hier vom Applikations-Zeitplan abhängt, ob die beiden Substanzen synergistisch oder antagonistisch wirken (Akutsu et al., 2002). Sie konnten auf hämatopetischen Tumorzellen nachweisen, dass eine zeitgleiche Applikation beider Chemotherapeutika zu einem antagonistischen Effekt führte, wohingegen eine um 24h zeitversetzte Applikation zu einem Synergismus führte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation von mindestens 12 h von VCR den antagonistischen Wirkeffekt minimieren kann. Jedoch kommt es zu keiner synergistischen Wirkung, was die Schlussfolgerung

nahelegt, dass die zeitversetzte Gabe in keinem Fall nachteilig ist im Vergleich zur simultanen Applikation.

5.3.2. Chemosensitivitätstests zur Identifizierung möglicher individueller antagonistischer Effekte

Polychemotherapie wird verabreicht, um dadurch die Resistenzentstehung zu verhindern, die möglichen Nebenwirkungen der Einzelsubstanzen zu minimieren, sowie die unterschiedlichen Wirkmechanismen auszunutzen, um möglichst viele Tumorzellen abzutöten. Die Grundlage zur Kombination einzelner Substanzen bildeten empirische Studien, die eine viel bessere Remissionsrate zeigten als durch eine Mono-Therapie, ohne jedoch die genauen molekularen Wirkmechanismen der Einzelsubstanzen oder der Kombinationen zu kennen (Benz et al., 2007, Dy und Adjei, 2008, Frei, 1985). Die *in vitro* erhobenen Erkenntnisse dieser Arbeit erlauben noch keine Rückschlüsse auf die komplexe Situation *in vivo*. Hier sind weitere präklinische und klinische Untersuchungen nötig. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich heterogene Ergebnisse für Leukämiezelllinien, was die Vermutung nahe legt, dass es möglicherweise große interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf gewissen Chemotherapeutika gibt.

Der Versuch das Ansprechen auf die chemotherapeutische Therapie oder die Rezidivwahrscheinlichkeit durch *in vitro* Untersuchungen vorherzusagen wird für sogenannte Chemosensitivitätstests erforscht (Galderisi et al., 2009, Kaspers et al., 1995). Diese haben zum Ziel vor Beginn einer Therapie die vom Patienten gewonnenen Leukämiezellen oder Biopsiematerial aus Tumoroperationen *in vitro* oder in einem Xenograft-Maus-Modell auf deren Ansprechen auf die unterschiedlichen Chemotherapeutika oder –Kombinationen zu untersuchen. Ein Sensitivitätstest für Prednisolon, Vincristin und Asparaginase wurde in ein Behandlungsprotokoll (COALL-97) der kindlichen akuten lymphatischen Leukämie (ALL) integriert, wodurch eine Verbesserung der Risikostratifizierung gelang (Escherich et al., 2010).

Allerdings bieten auch diese Methoden einige Nachteile, was möglicherweise erklärt, weshalb sie noch keinen Einzug in den routinemäßigen Einsatz in der klinischen Praxis gefunden haben. Viele dieser Tests untersuchen Einzelsubstanzen, nicht aber die Kombinationen. Es kommt hinzu, dass sich Tumorzellen auch innerhalb eines

Tumors bezüglich ihrer Eigenschaften unterscheiden können und so die Biopsieergebnisse bei soliden Tumoren keine repräsentativen Ergebnisse für alle Zellen des Tumors liefern. Zudem sind die Zellen aus Biopsiematerial in der Zellkultur nur kurz überlebensfähig, Mausmodelle dauern zu lange, um eine direkte Transferierung der Ergebnisse für die Therapie des Patienten zu erlauben.

5.4. Kritische Punkte der Medikamenteninteraktion von Doxorubicin und Vincristin in der Apoptosesignaltransduktion

Um dem Antagonismus mechanistisch auf den Grund zu gehen, war es das Ziel der Dissertation, zu untersuchen auf welcher Ebene Doxo die VCR-induzierte Apoptose inhibiert. Hierzu sollten die bekannten Signalwege der beiden Substanzen und die beteiligten Proteine der Apoptose-Signalkaskade und deren Aktivierung durch die Einzelsubstanzen und die Kombinationstherapien untersucht werden (Kapitel 4.2). Die von VCR induzierte Apoptose-Signalkaskade ist bisher noch nicht komplett entschlüsselt. Es ist bekannt, dass es zu einer Hemmung von Mikrotubuli-Bildung kommt, sowie Zellzyklusarrest, Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL, Phosphorylierung von Kinasen, Stabilisierung von p53 und NFκB (Mollinedo und Gajate, 2003). Einer der entscheidenden und proximalsten Schritte in der VCR-vermittelten Apoptosesignaltransduktion ist die Phosphorylierung von JNK, sowie die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der anti-apoptotischen Bcl-2-Familien-Mitglieder Bcl-2 und Bcl-xL (Blagosklonny et al., 1997, Poruchynsky et al., 1998, Yamamoto et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Applikation von Doxo und VCR die Phosphorylierung von JNK durch Vincristin nicht beeinflusst, wohingegen die Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL in der VCR-vermittelten Signaltransduktion durch die kombinierter Applikation mit Doxo fast komplett inhibiert wird. Diese Interferenz erfolgte somit an einem der proximalsten Schritte der VCR-vermittelten Apoptosesignalkaskade, der durch Doxo inhibiert wurde. Durch die fehlende Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Bcl-2 und Bcl-xL wurden auch die folgenden durch VCR aktivierten Schritte des Apoptosesignalweges wie Verlust des Mitochondrienmembranpotentials, Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung durch Doxo inhibiert.

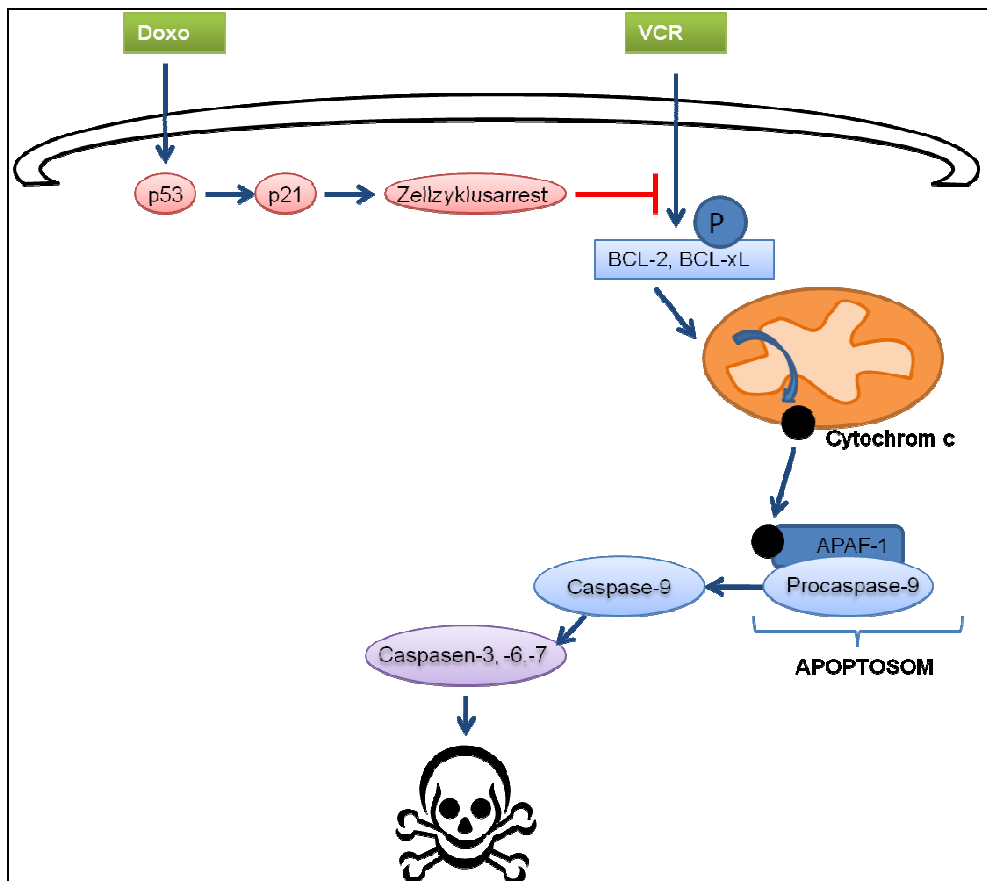


Abb. 25: Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus der Interaktion zwischen Vincristin und Doxorubicin. In den präsentierten Forschungsarbeiten kommt es nach VCR-Stimulation zu einer Phosphorylierung und damit Inhibierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL. Distal von Bcl-2 und Bcl-xL kommt es zum Verlust des MMP vermutlich durch die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und nachfolgend zur Aktivierung Caspase-9. Es werden die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktiviert, was schließlich zur Apoptose führt. Durch Doxo erfolgt in dem dargestellten experimentellen Setting die nukleäre Akkumulation von p53 und p21, was zum Zellzyklusarrest führt. Die dargestellten Wirkweisen legen die Vermutung nahe, dass die VCR-induzierte Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL durch die p53-Aktivierung und Zellzyklusarrest durch Doxo inhibiert wird.

Die Rolle des p53-vermittelten Zellzyklusarrestes durch zytostatische Chemotherapeutika in der Kombination mit zytotoxisch wirksamen Substanzen

Für Doxorubicin als interkalierende Substanz ist bekannt, dass es seine Wirkung entfaltet, indem es über DNA-Schädigung zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 kommt (Gerwitz, 1999, Minotti et al., 2004). p53 spielt eine zentrale Rolle im komplexen Antwort-System der Zelle auf DNA-Schaden und beinhaltet DNA-

Reparatur, Zellzyklusarrest, Transkription verschiedener regulatorischer Proteine und Apoptose (Kapitel 3.2.4).

In der vorliegenden Arbeit konnte auf molekularer Ebene nachgewiesen werden, dass es nach Applikation von Doxo alleine zu einer Akkumulation von p53 im Zellkern kommt. Diese Akkumulation blieb auch nach Kostimulation mit VCR erhalten (Kapitel 4.3). Um die Rolle von p53 im Antagonismus von Doxo und VCR weiter zu untersuchen wurde versucht mittels siRNA und shRNA einen knockdown von p53 herbeizuführen. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Transfektion wurde die Funktion von p53 in dem etablierten und schon oftmals in anderen Zusammenhängen verwendeten Zellkulturmodell der HCT116 Zellen untersucht. Der besondere Vorteil der derivativen HCT116 Zellen ist, dass sie kein p53- bzw. p21-Protein bilden können. Somit wurde auf ein Zellkultursystem zurückgegriffen, das die Wirkung von p53 und p21 sicher herausarbeiten konnte. Auf p53 defizienten HCT116-Zellen konnte der Nachweis erfolgen, dass durch den somatischen knockdown von p53 der Antagonismus überwunden werden kann (Kapitel 4.3.1).

In der Literatur ist beschrieben, dass p53 als Reaktion auf zellulären Stress und DNA-Schädigung über die vermehrte Expression des CDK-Inhibitors p21 zum Zellzyklusarrest führt (El-Deiry et al., 1994). Bereits 1995 wurde durch Waldmann et al. publiziert, dass DNA-Schädigung mittels Bestrahlung und durch Applikation einer DNA-schädigenden Substanz wie Doxorubicin in Colonicarcinomzellen HCT116 mit Wildtyp p21 zu einem Zellzyklus-Arrest in G1 führt, wohingegen dieser Arrest durch p21-downregulation aufgehoben werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es ebenfalls zu einer Akkumulation von p21 durch Doxo kommt, welche auch nach Ko-Stimulation mit VCR erhalten bleibt. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass in Zellen mit somatischem knockdown von p21 (HCT116 p21^{-/-}) der Antagonismus überwunden werden kann.

Einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe gelang nach Abschluss der vorgelegten Arbeit zusätzlich ein knockdown von p53 und p21 mittels shRNA auf Leukämie- und Neuroblastom-Zellen, unter anderem auf den in dieser Arbeit verwendeten SHEP-Zellen nach Anwendung eines lentiviralen Transfektionssystems (Ehrhardt et al., 2011, Ehrhardt et al., 2013). Mit dieser Verbesserung der Transfektionstechnik und Transfektionseffizienz mit effektivem *knockdown* von p53 und p21 ohne Erhöhung

der Toxizität konnte letztlich für alle untersuchten Tumorzelllinien einschließlich der SHEP Zellen gezeigt werden, dass der Antagonismus in Abwesenheit von p53, sowie p21 überwunden werden kann. Somit konnte die wichtige Rolle von p53 im Rahmen der inhibierenden Wirkung von Doxo auf die VCR-induzierte Apoptose untermauert werden. Durch den effektiven *knockdown* von p53 war Doxo nicht in der Lage den Zellzyklus in G2 zu arretieren.

In der Literatur ist beschrieben, dass p53 die G2/M Transition reguliert. p53 kann z.B. den Übergang zur Mitose im Zellzyklus verhindern, indem es Cdc2 inhibiert. Cdc2 bindet an Cyclin B1 um seine Wirkung zu entfalten. Die Inhibierung von Cyclin B1 durch p53 führt seinerseits ebenfalls zum Zellzyklusarrest in G2 (Taylor und Stark, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Zellzyklus-Analyse dargestellt werden, dass es durch die Einzelsubstanzen zu einem moderaten Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase kam, wobei dies für Vincristin nur vorübergehend war. Durch Ko-Applikation von Vincristin und Doxorubicin kam es zu einem ausgeprägten und anhaltenden Anstieg der Zellen in G2/M, was als Zellzyklusarrest in G2/M zu bewerten ist (Kapitel 4.4). Eine Schwäche dieser Methode ist, dass keine genauere Einteilung in Zellzyklus-Stadien erfolgen kann. Dazu sind andere Methoden und Spezialfärbungen nötig, welche nach Abschluss der Dissertation durch ein anderes Mitglied der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden.

Vincristin hemmt die Zellproliferation in der Mitose durch Mikrotubuli-Interaktion (Mollinedo und Gajate, 2003). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit und in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe erhobenen Daten zeigen, dass Vincristin einen aktiven Zellzyklus benötigt, um die volle antiapoptotische Wirkung zu entfalten. Durch den Doxo-vermittelten Zellzyklusarrest kann VCR nicht seine volle antiapoptotische Wirkung entfalten.

Anthrazykline sind nicht die einzigen zytostatischen Agenzien, die zum Zellzyklusarrest führen. γ -Bestrahlung arretiert den Zellzyklus in der G2-Phase (Jänicke et al., 2001), Dexamethason in der G1-Phase (Mattern et al., 2007). Eine andere Arbeitsgruppe (Sui et al., 2004) beschrieb den antiapoptotischen Effekt von γ -Bestrahlung in der Kombination mit Paclitaxel. Paclitaxel entfaltet ähnlich wie VCR seine zytotoxische Wirkung über Mikrotubuli-Interaktion. Sie konnte nachweisen, dass es durch γ -Bestrahlung zu einem Zellzyklusarrest in G2 kommt und es durch

die γ -Bestrahlung zu einer Inhibierung der Phosphorylierung von Bcl2-kommt, was sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit deckt.

Die dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass das simultane Verabreichen von zytostatischen und zytotoxischen Chemotherapeutika im Rahmen der aktuellen Polychemotherapieprotokolle umfassend überprüft werden sollte.

5.5. Weiterführende Ergebnisse der Arbeitsgruppe

5.5.1. Untermauerung der klinischen Relevanz durch Nachweis des Antagonismus bei primären Patientenzellen

Aufbauend auf den vorgelegten Untersuchungen wurde in Nachfolgeprojekten durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe die klinische Relevanz weiter untersucht. Dazu wurden primäre Patientenzellen von Kindern mit unterschiedlichen Subtypen einer akuten Leukämie untersucht, die nicht chemotherapeutisch vorbehandelt waren. Sowohl unter Zellkulturbedingungen als auch im Tiermodell der NOD/SCID-Maus nach Etablierung als Xenograft-Leukämiezellen konnte die antagonistische Wirkung bestätigt werden (Ehrhardt et al, 2011). Bei 11% (4/35) der Patientenproben zeigte sich eine synergistische Apoptoseinduktion durch die Kombination von VCR und Doxo. Bei 45% (19/35) der Patientenproben wurde ein additiver Effekt nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei 34% (12/35) eine antagonistische Wirkung von Doxo auf die VCR-induzierte Apoptose. Der Antagonismus war bei simultaner Applikation ausgeprägter als bei zeitversetzter. Im Tiermodell dieser Publikation konnte auch für die *in vivo* Situation gezeigt werden, dass die simultane Applikation von Doxo und VCR zu einem verminderten Effekt von Vincristin auf das Tumorwachstum führt (Ehrhardt et al., 2011).

Dies ist insofern von Relevanz, da nach den aktuellen Chemotherapieprotokollen während der Induktionstherapie der akuten Leukämie eine zeitgleiche Applikation von Vincristin und Doxorubicin erfolgt. Zukünftige klinische Studien sind nötig, um zu sehen, ob ein zeitversetztes Verabreichen von Vinca-Alkaloiden und Anthrazyklinen zu einer Verbesserung der Therapieeffizienz bei den Leukämien führen kann. Hierbei könnte z.B. durch sog. Chemosensitivitätstest geprüft werden, inwieweit die vorherige *in vitro* Testung eine Vorhersage über die Wirksamkeit *in vivo* erlaubt (Kapitel 5.3.2).

5.5.2. Der zentrale Regulationsschritt der fehlenden Phosphorylierung antiapoptotischer Bcl-2-Proteine nach VCR in der Kombination mit Doxo

Durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe (Ehrhardt et al., 2011) konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von Doxo auf die VCR-induzierte Apoptose durch die Vorbehandlung mit biochemischen Modulatoren, die die Expression von Bcl-2 und Bcl-xL verhindern wie DCPE (Villedieu et al., 2007) oder durch Phosphataseinhibitoren wie Calphostin c oder Okadasäure, die eine VCR-unabhängige Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL vermitteln, vermieden oder zumindest reduziert werden konnte. Dies untermauert die wichtige Bedeutung der fehlenden Phosphorylierung und damit Stabilisierung antiapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder für den Doxo-vermittelten Antagonismus.

5.5.3. Zellzyklusarrest durch andere zytostatische Chemotherapeutika als Grundlage für die antagonistische Wirkung auf die Vincristin vermittelte Apoptose

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Zellzyklusanalyse gezeigt werden, dass es durch die Kombination von Doxorubicin und Vincristin zu einem Zellzyklusarrest in G2/M kommt. Um aber die Zellzyklusstadien weiter zu differenzieren benötigt man eine Spezialfärbung mit Propidium-Iodid und Phospho-Histon H3 (Ser 10). Diese Untersuchung wurde durch Ehrhardt et al., 2011 publiziert und zeigt, dass VCR alleine zu einem Zellzyklusarrest in M führt, wohingegen die Applikation von Doxo durch Zellzyklusarrest in der G2-Phase zu einer Behinderung der M-Transition führt. Zellzyklusstimulatoren wie Coffein oder KU55933 konnten in dieser Arbeit die Zellen für die VCR-induzierte Apoptose sensibilisieren, wohingegen der knockdown von Cyclin A zum Zellzyklusarrest in G2 führte und dadurch ähnlich wie Doxo die VCR-induzierte Apoptose inhibierte. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der p53-vermittelte Zellzyklus-Arrest der entscheidende Schritt in der Doxo-vermittelten Inhibierung der VCR-induzierten Apoptose ist.

Die Antagonisierung der Vincristin-vermittelten Apoptose war nicht beschränkt auf Doxorubicin als zytostatisch wirksames Chemotherapeutikum, sondern konnte in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe auch für andere Substanzen nachgewiesen werden, welche zu einem Zellzyklusarrest führen. So konnte auch für

γ -Bestrahlung auf Leukämie-Zellen sowie für γ -Bestrahlung und Dexamethason auf soliden Tumorzellen (Ehrhardt et al., 2011) der antagonistische Effekt im Bezug auf die VCR-induzierte Apoptose nachgewiesen werden.

In einer 2013 von Ehrhardt et al. veröffentlichten Arbeit wurden weitere zytostatische Chemotherapeutika (Cyclophosphamid, Etoposid, 5-Fluorouracil und Methotrexat) untersucht und es konnte gezeigt werden, dass diese analog zu Doxorubicin bei 100% (5/5) der untersuchten Zelllinien von unterschiedlicher Entität (Neuroblastom, Lungenzellcarcinom, Nierenzellcarcinom, Colonicarcinom) die VCR-induzierte Apoptose inhibieren. Zur Untermauerung der klinischen Relevanz dieser Ergebnisse wurden primäre Patientenzellen unterschiedlicher ALL-Subtypen untersucht. Hier konnte für Methotrexat bei 50% (6/12) Zelllinien, für Cyclophosphamid bei 66,7% (8/12), für Etoposid bei 50% (6/12) Zelllinien der Antagonismus nachgewiesen werden. Ein additiver Effekt konnte bei 41,7% (5/12) Zelllinien für Methotrexat, bei 25% (3/12) Zelllinien für Cyclophosphamid und bei 41,7% (5/12) Zelllinien für Etoposid nachgewiesen werden. Eine synergistische Wirkung trat jeweils nur bei einer Zelllinie auf.

In der nachfolgend durchgeführten Zellzyklus-Analysen konnte für Methotrexat ein Arrest in G1, sowie für die anderen Zytostatika ein Arrest in G2 festgestellt werden, sowie eine fehlende Transition in die M-Phase bei der Kombinationstherapie mit VCR. Für Etoposid, welches den Zellzyklus in der G2-Phase arretiert und Methotrexat, welches zu einem Zellzyklusarrest in G1 führt, kam es, analog zu den Ergebnissen für Doxorubicin in der vorliegenden Dissertation, zu einer Aktivierung von p53 und p21, in der Folge zu einer Inhibierung der Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL und damit fehlender Caspasen-Aktivierung, was einen antagonistischen Effekt auf die VCR-induzierte Apoptose zur Folge hatte.

Da Vinca-Alkaloide in den gängigen Chemotherapieprotokollen zur Behandlung von kindlichen akuten lymphatischen Leukämien (ALL) auch mit anderen zytostatisch wirksamen Chemotherapeutika kombiniert, ist eine kritische Reevaluation des Wirkeffektes dieser Kombinationstherapien unter kritischer Reevaluation der Effekte auf den Zellzyklus dringend erforderlich.

5.5.4. Die Rolle des DNA-Reparatursystems in der Interaktion zwischen zytostatisch wirksamen Chemotherapeutika und Vincristin

Die Rolle von p53 in der antagonistischen Interaktion zwischen zytostatisch wirksamen Substanzen und Vincristin wurde in der vorliegenden Dissertation beschrieben und durch Folge-Experimente der Arbeitsgruppe untermauert (Ehrhardt et al., 2011, Ehrhardt et al., 2013). p53 spielt eine zentrale Rolle im DNA-Reparatursystem der Zelle, weshalb es auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wurden (Lane, 1992). Proximal von p53 kommt es durch DNA-Schädigung zu einer Aktivierung der ATM-Kinase („Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase“) und ATR („Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein“). ATM und ATR aktivieren dann Chk1 („Checkpoint Kinase“)(Dai und Grant, 2010). Ehrhardt et al. (2013) zeigten, dass ein *knockdown* von Chk1 mittels shRNA den antagonistischen Effekt von Doxo, Etoposid und Methotrexat auf die Vincristin-induzierte Apoptose beheben konnte. Durch den gleichzeitigen *knockdown* von ATM und ATR konnte der inhibitorische Effekt von Doxorubicin und Etoposid, nicht aber von Methotrexat aufgehoben werden. Somit ist die Aktivierung von Chk-1 der erste gemeinsame Schritt der Signaltransduktion des Zellzyklus-arretierenden Signals.

5.6. Ausblick auf weiterführende Forschungsarbeiten

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Daten der hier vorgelegten Arbeit sowie die der auf dieser Arbeit aufbauenden Arbeiten zusammengefasst. Doxorubicin hat bei Tumor- und Leukämiezelllinien unterschiedlicher Entität, und auch bei primären Patientenzellen und bei *in vivo* Therapiemodellen einen antagonistischen Effekt auf die Vincristin-induzierte Apoptose. Hierbei konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit und durch die darauf aufbauenden weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe die Aktivierung des DNA-Reparatursystems (Chk, ATM/ATR) mit nachfolgender Aktivierung von p53 und p21 sowie der resultierende Zellzyklusarrest als zentrale Regulationsmechanismen des beschriebenen Antagonismus herausgestellt werden. Dies konnte nicht nur für Doxorubicin, sondern auch für andere zytostatisch wirksame Substanzen (Etoposid, Methotrexat) nachgewiesen werden. In den letzten Jahren wurde viel publiziert über Chk- oder ATR-Inhibitoren, welche Tumorzellen gegenüber zytotoxische Substanzen sensitivieren indem der

Zellzyklusarrest in G2/M überwunden werden kann (Montano et al., 2012, Peasland et al., 2011, Visconti et al. 2016). Bisher gibt es keine Untersuchungen für die Kombination von Anthrazyklinen und Vinca-Alkaloiden mit solchen Inhibitoren. Möglicherweise bietet dies einen Ansatzpunkt den Anthrazyklin-vermittelten Zellzyklusarrest zu überwinden um so die Vinca-Alkaloid-Wirkung zu verbessern.

Es gibt bereits seit Langem Diskussionen und kritische Überlegungen darüber, ob zytotoxisch und zytostatisch wirksame Substanzen kombiniert werden sollten. Ein Problem hierbei stellt sicher dar, dass nicht alle Chemotherapeutika klar nur einer der beiden Gruppen zugeordnet werden können (Rixe und Fojo, 2007). Dies verdeutlicht, wie wichtig es ist, weitere Studien mit anderen zytostatisch wirksamen Chemotherapeutika durchzuführen, um deren molekulare Wirkmechanismen besser zu verstehen und mögliche Interaktionen mit Zellzyklus-abhängigen Agenzien wie Vinca-Alkaloiden zu identifizieren. Vinca-Alkaloide und Anthrazykline gehören nach wie vor zu den potentesten Chemotherapeutika und werden seit Langem erfolgreich in der antineoplastischen Therapie im Rahmen von Polychemotherapieprotokollen eingesetzt (Bates und Eastman, 2016, Tacar, 2012), wenngleich noch nicht alle Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion entschlüsselt sind. Zusätzlich zur Erforschung neuer antineoplastischer Substanzen ist es daher sinnvoll zunächst die molekularen Wirkmechanismen der Einzelsubstanzen und der Kombinationstherapien der bisher bekannten und im klinischen Alltag verwendeten Chemotherapeutika zu identifizieren um auf Basis dieses Wissens deren Effektivität in der Kombinationstherapie zu steigern.

Zudem könnte die weitere Erforschung sog. Chemosensitivitätstest zur Untersuchung der verschiedenen Chemotherapie-Kombination auf Leukämiezellen oder Biopsiematerial von soliden Tumorzellen dazu führen die Therapie weiter zu individualisieren und damit die Remissionsrate und die Überlebenschancen zu verbessern.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zeitversetzte Applikation von Vincristin und Doxorubicin *in vitro* eine Möglichkeit darstellt den Antagonismus zu überwinden. Im Rahmen der aktuellen Chemotherapieprotokolle werden Vinca-Alkaloide und Anthrazykline zumeist simultan am selben Tag verabreicht. Die hier neu gewonnen Erkenntnisse zeigen, dass es weiterer präklinischer und klinischer Studien bedarf, welche versuchen einen optimierten Applikationszeitplan zu erstellen

um damit letztlich die Polychemotherapie effektiver zu gestalten und damit die Prognose der Patienten zu verbessern.

6. Zusammenfassung

Chemotherapeutika wie Vinca-Alkaloide und Anthrazykline werden in der Tumorthherapie im Rahmen von Polychemotherapie-Protokollen bei verschiedenen Tumorentitäten gleichzeitig am selben Tag verabreicht mit dem Ziel einer synergistischen Wirkverstärkung bei kombinierter Therapie. Beide Chemotherapeutikasubstanzgruppen induzieren in Tumorzellen sehr effektiv Apoptose. Die molekularen Mechanismen der Wirkung der Kombinationstherapie und mögliche Interaktionen sind bisher unzureichend untersucht.

Vorarbeiten aus meiner Arbeitsgruppe vor Aufnahme der Dissertation zeigten zum ersten Mal, dass Doxorubicin auf Leukämiezellen einen antagonistischen Effekt auf die Vincristin-induzierte Apoptose hat. Ausgehend von dieser überraschenden Erkenntnis war es Ziel meiner Doktorarbeit die Häufigkeit dieser Medikamenteninteraktion auf Tumorzelllinien und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Wirkinteraktion zwischen Doxorubicin und Vincristin zu ermitteln. Mittels FACScan-Apoptoseanalyse konnte gezeigt werden, dass Doxorubicin auch auf der Neuroblastom-Zelllinie SHEP, somit einer weiteren Tumorentität, die in aktuellen Therapieprotokollen mit der Kombination behandelt wird, die VCR-induzierte Apoptose inhibiert. Der antagonistische Effekt konnte vermindert werden, wenn die beiden Substanzen zeitversetzt verabreicht wurden, und zwar wenn Vincristin vor Doxorubicin appliziert wurde, nicht aber wenn Doxorubicin zuerst appliziert wurde. Der antiapoptotische Effekt war nicht begrenzt auf die Kombination von Doxorubicin und Vincristin, sondern konnte auch für die Kombination von Vincristin mit anderen Anthrazyklinen und von Doxorubicin mit weiteren Vinca-Alkaloiden nachgewiesen werden. Somit handelt es sich um eine generelle Interaktion zwischen den beiden Substanzgruppen. Bei der weiteren Quantifizierung des Antagonismus zeigte sich, dass bei insgesamt 75% (9/12) der untersuchten Zelllinien, die in aktuellen Chemotherapieprotokollen mit der Kombination behandelt werden ein antiapoptotischer Effekt von Doxorubicin auf die Vincristin-induzierte Apoptose bestand.

Um den Signalmechanismus, der dem Antagonismus zugrunde liegt, zu ermitteln, wurden die bekannten Schritte der intrazellulären Signaltransduktion beider Substanzen näher analysiert und die wichtigsten intrazellulären Proteine der Apoptosesignalkaskade exemplarisch für SHEP- und A498-Zellen untersucht. Der

erste Schritt des Vincristin-vermittelten intrinsischen Apoptose-Signalweges, der von Doxorubicin inhibiert wurde, war die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von anti-apoptotischem Bcl-2 und Bcl-xL. In der Folge konnte gezeigt werden, dass die nachfolgenden Schritte der Apoptoseinduktion durch Vincristin wie Verlust des Mitochondrien-Membran-Potentials, Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung durch Doxorubicin inhibiert wurden. Doxorubicin wiederum führte als interkalierende Substanz durch DNA-Schaden zu einer starken Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Mittels Western Blot konnte nachgewiesen, dass die nukleäre p53-Ansammlung in der Kombination mit Vincristin unbeeinflusst blieb. Die Ergebnisse legen nahe, dass die nachfolgende Aktivierung von p21 und der Zellzyklusarrest in G2/M für die Interaktion von Doxorubicin mit der Apoptoseinduktion durch Vincristin verantwortlich sind. Durch die Verwendung von HCT116 Zellen mit Verlust von p53 bzw. p21 konnte nachgewiesen werden, dass bei Fehlen von p53 bzw. p21 der Antagonismus nicht auftritt. Die Zusammenschau der Ergebnisse zur Rolle von p53 und p21 sowie die Zellzyklusverteilung nach Stimulation mit Doxo, VCR oder der Kombination legt nahe, dass die inhibierende Wirkung von Doxorubicin für Apoptose durch VCR über den Zellzyklusarrest erfolgt.

7. Literaturverzeichnis

Akutsu M, Furukawa Y, Tsunoda S, Izumi T, Ohmine K, Kano Y. Schedule-dependent synergism and antagonism between methotrexate and cytarabine against human leukemia cell lines in vitro. *Leukemia* 2002; 16: 1808-1817

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti apoptotic gene, survivin, is expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3:183-189

Ambrosini, G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998; 273: 11177–11182

Bar-On O, Shapira M, Hershko DD. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 2007;18(10):1113-21

Bates D and Eastman E. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2016; 10:1111/bcp.13126

Bendall LJ. It's all in the timing. *Blood* 2011; 118: 5983–5984.

Benz EJ Jr., Nathan DG, Amaravadi RK, Danial NN. Targeting the Cell Death-Survival Equation. *Clin Cancer Res.*2007; 13(24): 7250-7253

Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, Schumacher KR, Feng Z, Porter AG, Castle VP, Opipari Jr. AW. NF- κ B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 48921-48929

Blagosklonny MV, Giannakakou P, El-Deiry WS, Kingston DGI, Higgs PI, Neckers L, Fojo T. Raf-1/Bcl-2 phosphorylation: A step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* 1997; 57: 130-135

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497–1501

Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590–8607

Dai Y and Grant S. New Insights into Checkpoint Kinase 1 (Chk1) in the DNA Damage Response (DDR) Signaling Network: Rationale for Employing Chk1 Inhibitors in Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 2010; 16(2): 376–383

Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 2003; 115(1): 61-70

Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; 22: 8543-8567

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Arsdale TV, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998; 17(8): 2215–2223

Dhanasekaran DN and Reddy EP. JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene* 2008; 27(48): 6245–6251

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a Mitochondrial Protein that promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell*. 2000; 102: 33-42

Dy GK, Adjei AA. Systemic cancer therapy: evolution over the last 60 years. *Cancer*. 2008; 113(7 suppl): 1857-1887

Ehrhardt H, Pfeiffer S, Schrembs D, Wachter F, Gruntert M, Jeremias I. Activation of DNA Damage Response by Antitumor Therapy Counteracts the Activity of Vinca Alkaloids. *Anticancer Res* 2013; 33: 5273-5288

Ehrhardt H, Schrembs D, Moritz C, Wachter F, Haldar S, Graubner U, Nathrath M, Jeremias I. Optimized anti-Tumour effects of anthracyclines plus Vinca alkaloids using a novel, mechanism-based application schedule. *Blood* 2011; 118: 6123-6131

Eksborg S. Pharmacokinetics of anthracyclines. *Acta oncol* 1989; 28(6): 873-6

El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietsenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan ME,

Kohn KE, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G₁ arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54: 1169-1174

Escherich G, Horstmann MA, Zimmermann M, Janka-Schaub GE on behalf of the COALL study group. Cooperative study group for childhood acute lymphoblastic leukaemia (COALL): long-term results of trials 82,85,89,92 and 97. *Leukemia* 2010; 24: 298–308

Estlin EJ, Ronghe M, Burke GA, Yule SM. The clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids, L-asparaginase, anthracyclines and cyclophosphamide in relation to childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 110(4): 780-790.

Frei E. Combination chemotherapy. *Proc R Soc Med* 1974; 67(6): 425-433

Frei E. Curative cancer chemotherapy. *Cancer Res* 1985; 45(12): 6523-6537

Frosr BM, Eksborg S, Bjork O, Abrahamson J, Behrendtz M, Casto A, Forestier E, Lonnerholm G. Pharmacokinetics of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38(5): 329-37

Galderisi F, Stork L, Motomi Mori JL, Mongoue-Tchokote S, Huang J. Flow Cytometric Chemosensitivity Assay As A Predictive Tool of Early Clinical Response in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Oct; 53(4): 543–550.

Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 727–741.

Gidding CEM, Kellie SJ, Kamps WA, Graaf SSN. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 29:267–287

Giono LE und Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J of Cel Physiol* 2006; 209(1): 13–20

Giannakakou P, Nakano M, Nicolaou KC, O'Brate A, Yu J, Blagosklonny MV, Greber UF, Fojo T. Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear

accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; 99: 10855-10860

Green DR, Kroemer G. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* 2004; 305: 626-629

Green DR, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312

Goldin A, Johnson RK. Antitumor effect of adriamycin in comparison with related drugs and in combination chemotherapy. In: *Staquet M, Tagnon H, Kenis Y, eds. Adriamycin Review. Ghent, Belgium: European Press Medikon; 1975: 37-54*

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776

Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001; 98: 2603-2614

Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; 277/5: 3247–3257

Hussain SP und Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: Contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 1998; 58(18): 4023-4037

Jänicke RU, Engels IH, Dunkern T, Kaina B, Schulze-Osthoff K, Porter AG. Ionizing radiation but not anticancer drugs causes cell cycle arrest and failure to activate the mitochondrial death pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 5043–5053

Jensen PB, Sørensen BS, Demant EJ, Sehested M, Jensen PS, Vindeløv L, Hansen HH. Antagonistic effect of aclarubicin on the cytotoxicity of etoposide and 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide in human small cell lung cancer cell lines and on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. *Cancer Res* 1990; 50(11): 3311-6

Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Furuta M, Yazawa Y, Ando J. Schedule-dependent synergism and antagonism between paclitaxel and methotrexate in human carcinoma cell lines. *Oncol Res* 1998; 10(7): 347-54

Karin M, Cao Y, Greten F, Li Z-W. NF κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature* 2002; 2: 301-310

Karl S, Pritschow Y, Volcic M, Häcker S, Baumann B, Wiesmüller L, Debatin KL, Fulda S. Identification of a novel pro-apoptotic function of NF κ B in the DNA damage response. *J Cell Mol Med* 2009; 13 (10): 4239-4256

Kaspers GJ, Veerman AJ, Pieters R, Van Zantwijk I, Hählen K, Van Wering ER. Drug combination testing in acute lymphoblastic leukemia using the MTT assay. *Leuk Res.* 1995; 19(3): 175-181

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53: 3976–3985

Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ* 2012; 19: 42-50

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlia M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-5588

Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of cell death by poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 2005; 52(1): 5-14

Korchak HM, Rich AM, Wilkenfeld C, Rutherford LE, Weissmann G. A carbocyanine dye, DiOC6(3), acts as a mitochondrial probe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 108: 1495-1501

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1166-1173

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell Death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99-163

Kroemer G und Reed JC: Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6: 513-519

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381):15-6

Lee E-W, Seo J, Manhuyung J, Sangsik L, Song J. The roles of FADD in apoptosis and necrobiosis. *BMB reports* 2012; 45(9): 496-508

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002; 2: 183-192

Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1999 Dec; 1(8): 461-6

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, carlomarchisio P, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-583

Li P, Nijhanwan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489

Lüpertz R, Wätjen W, Kahl R, Chovolou Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology* 2010; 271(3): 115-21

MacKenzie SH, Clark AC. Targeting cell death in tumors by activating caspases. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 98-109

Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC. The Mitochondrial F0F1-ATPase Proton Pump Is Required for Function of the Proapoptotic Protein Bax in Yeast and Mammalian Cells. *Mol Cell* 1998; 1: 327–336

Mattern J, Büchler MW, Herr I. Cell cycle arrest by glucocorticoids may protect normal tissue and solid tumors from cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 1345–1354

Mauro F, Madoc-Jones H. Age Responses of Cultured Mammalian Cells to Cytotoxic Drugs. *Cancer Res* 1970; 30: 1397-1408

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185-229

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805

Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 631-636.

Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, Microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 413-450

Montano R, Chung I, Garner KM, Parry D, Eastman A. Preclinical development of the novel Chk1 inhibitor SCH900776 in combination with DNA-damaging agents and antimetabolites. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 427–38.

Nakano K and Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139: 271-279

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288: 1053-1058

Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA . Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. *Oncogene* 2007; 26(51): 7222-30

- Peasland A, Wang LZ, Rowling E, Kyle S, Chen T, Hopkins A, Cliby WA, Sarkaria J, Beale G, Edmondson RJ, Curtin NJ.** Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer* 2011; 105: 372–81.
- Perego P, Corna E, De Cesare M, Gatti L, Polizzi D, Pratesi G, Supino R, Zunino F.** Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines. *Curr Med Chem* 2001; 8: 31–37.
- Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV, Fojo T.** Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* 1998; 58: 3331-3338
- Rahmani R, Zhou XJ** Pharmacokinetics and metabolism of vinca alkaloids. *Cancer Surv* 1993; 17: 269-81
- Reed JC.** Mechanisms of Apoptosis. *AJP* 2000; 157(5): 1415-1428
- Rixe O, Fojo T.** Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? *Clin Cancer Res* 2007; 13(24): 7280-7287.
- Roy N, Deveraux QL, Takashashi R, Salvesen GS, Reed JC.** The c-IAP-1 and c-IaP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 6914–6925.
- Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS.** BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 842-849
- Sui M, Dziadyk JM, Zhu X, Fan W.** Cell cycle-dependent antagonistic interactions between paclitaxel and gamma-radiation in combination therapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(14): 4848-57
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R.** A Serine Protease, HtrA2, is released from the Mitochondria and Interacts with XIAP, Inducing cell Death. *Mol Cell* 2001; 8: 613-621
- Suzuki K und Matsubara H.** Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011; 978312

- Tacara O, Sriamornsakb P, Dassa CR.** Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J of Pharm Pharmacol* 2012; 65(2): 157-170
- Tamm, I, Want Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC.** IAP-family protein surviving inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 59: 5315–5320
- Taylor WR, Stark GR.** Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20(15): 1803–1815
- Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y.** JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J* 2004; 23(8): 1889-99
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Conolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL.** Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that promotes Apoptosis by Binding and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53
- Villedieu M, Briand M, Duval M, He´ron JF, Gauduchon P, Poulain L.** Anticancer and chemosensitizing effects of 2,3-DCPE in ovarian carcinoma cell lines: link with ERK activation and modulation of p21WAF1/CIP1, Bcl-2 and Bcl-xL expression. *Gynecol Oncol* 2007; 105(2): 373-384.
- Visconti R, Monica R, Grieco D.** Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; 35:153
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.** Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310
- Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B.** p21 Is Necessary for the p53-mediated G₁ Arrest in Human Cancer Cells. *Cancer Res* 1995; 55: 5187-5190
- Wang S, Kotamraj S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B.** Activation of nuclear factor- κ -B during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic : the role of hydrogen Peroxide. *Biochem J* 2002; 367: 729-740

Webb JL (1963). Effect of more than one inhibitor. In: Webb JL (ed). *Enzymes and Metabolic Inhibitors*, vol 1. *Academic Press: New York*. 1963; 66-79

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RL. Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139(5): 1281–1292

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 8469–8478

Yee KS, Vousden KH. Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. *Apoptosis* 2008; 13: 87-95

Yingjie Zhang, Da Xing, and Lei Liu. PUMA Promotes Bax Translocation by Both Directly Interacting with Bax and by Competitive Binding to Bcl-X_L during UV-induced Apoptosis. *Mol Biol Cell* 2009; 20 :3077–3087

Zeller WJ, Berger M, Schmähl D. Synergistic Action of Vincristine and Adriamycin in the Treatment of Experimental Rat Leukemia L5222. *Cancer Res* 1979; 39 (3): 1071-1073

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1 cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549-11556.

8. Danksagung

Für das gute Gelingen einer Doktorarbeit ist nicht nur derjenige verantwortlich, der sie schreibt, sondern auch diejenigen Menschen, die einen auf diesem Weg begleiten und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater Harald Ehrhardt für seine außerordentlich wertvolle Unterstützung danken. Die freundliche Betreuung, die bereichernden Gespräche und der konstruktive Austausch haben bedeutend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen und für den wissenschaftlichen und bereichernden Austausch bedanke ich mich bei Irmela Jeremias.

Ein besonderer Dank für die wundervolle Zeit im Labor mit vielen privaten Unternehmungen gilt meinen Mitdoktoranden und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ‚Apoptose‘ Ines Höfig, Sybille Gasser (geb. Gündisch), Katja Schneider, Amparo Hausherr-Bohn, Lisa Kroll, Michaela Grunert und Lili Mura.

Vielen Dank den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner Familie und meinen Freunden, darunter vor allem Lisa Kiechle (geb. Schober) für die moralische Unterstützung in dieser und allen anderen Lebenslagen.

Für die bedingungslose Liebe, die Unterstützung und den Zuspruch während der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich auch und vor allem meinem wunderbaren Mann Robin danken.

Zuletzt gilt mein Dank den besten Eltern der Welt. Durch die „Wurzeln und Flügel“, die sie mir mitgegeben haben, haben sie mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Lina Wolf, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Phänotyp und intrazelluläre Signaltransduktion der antagonistischen Wirkung von Anthrazyklinen auf Apoptoseinduktion durch Vinca-Alkaloide

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Lina Wolf